Postverlagsort Berlin

ZEITSCHRIFT FÜR ZELLFORSCHUNG UND MIKROSKOPISCHE ANATOMIE

HERAUSGEGEBEN UND REDIGIERT VON

W. BARGMANN
KIEL

B. SCHARRER
NEW YORK

J. SEILER
ZÜRICH

54. BAND, 2. HEFT

MIT 91 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 4. MAI 1961)

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1961

Z. Zellforsch.

Preis DM 44,80

Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie

Begründet 1924 unter dem Titel: Zeitschrift für Zellen- und Gewebelehre. Redigiert von *R. Goldschmidt* und *W. von Möllendorff*. Bd. 2—28 (1938). Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie. (Bd. 1—20), 1934 als: Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie Abteilung B) herausgegeben von *R. Goldschmidt, W. von Möllendorff, H. Bauer, J. Seiler*. Bd. 29—33 (1944) Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie Abteilung A. Allgemeine Zellforschung und mikroskopische Anatomie. Herausgegeben und redigiert von *W. von Möllendorff* und *J. Seiler*, Berlin, Springer. Bd. 34—35 (1948—1950) Springer, Wien, ab Bd. 36 Springer, Berlin, ab Bd. 34 ohne den Untertitel Abteilung A, Allgemeine Zellforschung usw.

Ab Bd. 2 (1925) mit dem Untertitel: Fortsetzung des Schultze-Waldeyer-Hertwigschen Archivs für mikroskopische Anatomie. [Dieses wurde begründet 1864. Bd. 1—13 (1876) herausgegeben von *Max Schultze*; Bd. 13, Heft 4, bis Bd. 35 (1890) herausgegeben von *v. La Valette St. George, W. Waldeyer*; Bd. 36—43 (1894) herausgegeben von *O. Hertwig, v. La Valette St. George, W. Waldeyer*. Ab Bd. 44 als Archiv f. mikroskopische Anatomie und Entwicklungsgeschichte, ab Bd. 77—95 (1910—1922) in 2 Abteilungen. Bd. 1—95, Bonn, Cohen. Ab Bd. 96 Berlin, Springer. Fortsetzung Bd. 98—104 (1923—1925) Archiv für mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik. Herausgegeben von *W. Roux, H. Braus, H. Spemann*.]

Die Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie steht Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der beschreibenden und experimentellen Zellen- und Gewebelehre sowie dem Gebiet der mikroskopischen Anatomie des Menschen und der Tiere offen, wobei Arbeiten mit funktionellem und experimentellem Inhalt bevorzugt werden.

Arbeiten karyologischen Inhalts werden an die Zeitschrift „Chromosoma", Arbeiten zur histochemischen und histophysikalischen Grundlagenforschung, insbesondere ihrer Methodik, an die Abteilung „Histochemie" weitergeleitet.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung rascher Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind. Der Autor verpflichtet sich, sie auch nachträglich nicht an anderer Stelle zu publizieren. Mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag geht das Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder einschließlich des Rechts der fotomechanischen Wiedergabe oder einer sonstigen Vervielfältigung an den Verlag über. Jedoch wird gewerblichen Unternehmen für den innerbetrieblichen Gebrauch nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels e.V. und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens die Anfertigung einer fotomechanischen Vervielfältigung gestattet. Wenn für diese Zeitschrift kein Pauschalabkommen mit dem Verlag vereinbart worden ist, ist eine Wertmarke im Betrage von DM 0.30 pro Seite zu verwenden. *Der Verlag läßt diese Beträge den Autorenverbänden zufließen.*

Bei Arbeiten aus Instituten ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Alle Manuskripte sind zu senden und Anfragen zu richten an:

Prof. Dr. W. Bargmann, Kiel, Anatomisches Institut der Universität, Neue Universität, Eingang F 1,

Prof. Dr. Berta Scharrer, Albert Einstein College of Medicine, Dept. of Anatomy, Eastchester Road and Morris Park Avenue, New York 61, N.Y., USA,

Prof. Dr. J. Seiler, Zürich 6, Sonneggstr. 45.

Springer-Verlag

Berlin-Wilmersdorf, Heidelberger Platz 3, Fernsprecher 830301, Fernschreibnummer 01-83319
Heidelberg, Neuenheimer Landstr. 28—30, Fernsprecher 27901, Fernschreibnummer 04-61723

54. Band — 2. Heft

Inhaltsverzeichnis

Seite

Hudson, G., and J. Francis Hartmann, The relationship between dense bodies and mitochondria in motor neurones. With 9 Figures in the Text 147

Cauna, N., and P. Alberti, Nerve supple and distribution of cholinesterase activity in the external nose of the mole. With 12 Figures in the Text 158

Bucher, O., und E. Reale, Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung der juxtaglomerulären Spezialeinrichtungen der Niere. I. Mitteilung. Problemstellung und erste Beobachtungen. Mit 10 Textabbildungen 167

Cotte, G., et N. Cotte, Etude ultrastructurale d'images de fonte holocrine dans la cortico-surrénale. Avec 14 Figures dans le Texte 182

Lierse, W., Die Kapillarabstände in verschiedenen Hirnregionen der Katze. Mit 5 Textabbildungen 199

Knoche, H., Morphologisch-experimenteller Beitrag zum lichtmikroskopischen Bau des vegetativen Nervensystems. I. Mitteilung. Die Endigungsweise der präganglionären Nervenfasern. Mit 13 Textabbildungen 207

Meyer, G. F., Interzelluläre Brücken (Fusome) im Hoden und im Ei-Nährzellverband von *Drosophila melanogaster*. Mit 11 Textabbildungen 238

Carsten, P.-M., Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Sinuswand menschlicher fetaler Lebern. Mit 5 Textabbildungen 252

Nakajima, Y., Electron microscope observations on the nerve fibers of *Cristaria plicata*. With 12 Figures in the Text 262

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinn der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Zeitschrift für Zellforschung 54, 147—157 (1961)

From the Department of Anatomy
University of Minnesota, Minneapolis, U.S.A.

THE RELATIONSHIP BETWEEN DENSE BODIES AND MITOCHONDRIA IN MOTOR NEURONES*

By
George Hudson** and J. Francis Hartmann

With 9 Figures in the Text

(Received December 22, 1960)

Dense bodies (microbodies, cytosomes) have been noted by a number of investigators in the cytoplasm of various types of cell. They appear to have been described first by Sjöstrand and Rhodin (1953) in the cells of the renal tubule, and their presence in nerve cells was noted by Palay and Palade (1955). Different views have been put forward as to the functional significance of dense bodies. Palay and Palade (1955) referred to these bodies as lipid inclusions. The work of de Duve, Pressman, Gianetto, Wattiaux and Appelmans (1955) and Novikoff, Beaufay and de Duve (1956) suggested that dense bodies were related to lysosomes, which in tissue fractionation studies showed considerable differences in enzyme content from those of the mitochondrial fraction; for example, the lysosome fraction was rich in acid phosphatase, whereas typical mitochondria are probably free from this enzyme (Appelmans, Wattiaux and de Duve 1955). On the other hand, Rouiller and Bernhard (1956), Rouiller (1957), Belt (1958) and Schulz (1958) put forward the view that dense bodies might give rise to mitochondria. With reference to this problem, it seemed important to carry out further study of dense bodies using the electron microscope. This report presents the results obtained. The observations were made during the course of a re-investigation of the changes in mitochondrial number following axonal section (Hartmann 1948, 1954).

Materials and Methods

Twenty healthy female albino rabbits weighing 2—4 kg were used. The right hypoglossal nerve was divided under pentobarbital sodium anesthesia and the animals sacrificed 4—16 days after operation. Cells of the hypoglossal nuclei of both sides were studied in thin sections. The tissues were fixed in 1,0% buffered osmium tetroxide, embedded in methacrylate and sectioned with either the glass knife (Latta and Hartmann 1950) or the diamond knife (Fernández-Morán 1953). The section were studied in a Siemens Elmiskop I and photographed at initial magnifications ranging up to 32000×.

The number of mitochondria and dense bodies were counted in the total area of 100 micrographs obtained from 10 animals killed 10—11 days after operation. Fifty were from the cytoplasm of neurones of the left side and fifty were from the right side. The results have been corrected to a constant print area of 340 sq. cm. and a magnification of 37750×.

* Supported by Research Grants M-388 and B-782 from the National Institute of Mental Health and the National Institute of Neurological Diseases and Blindness, U.S. Public Health Service.

** On leave from the Department of Anatomy, The University, Bristol, England.

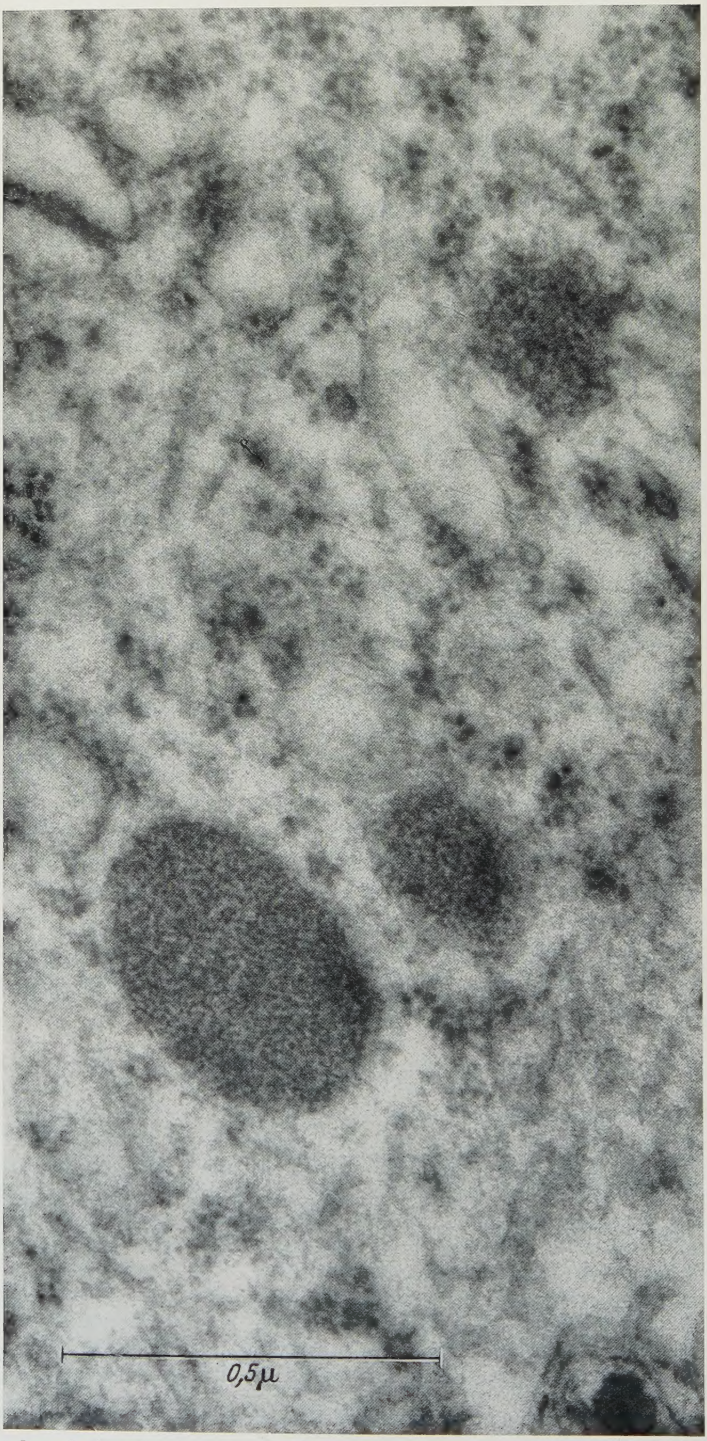

Fig. 1. Three dense bodies showing granular structure. The upper has an indefinite outline, the smaller of the two lower ones is somewhat more circumscribed whilst the larger one is well-circumscribed, although it shows no definite limiting membrane. These illustrate the simplest forms encountered (× 100 000). All the figures were taken from the cytoplasm of motor nerve cells of the hypoglossal nucleus of rabbits

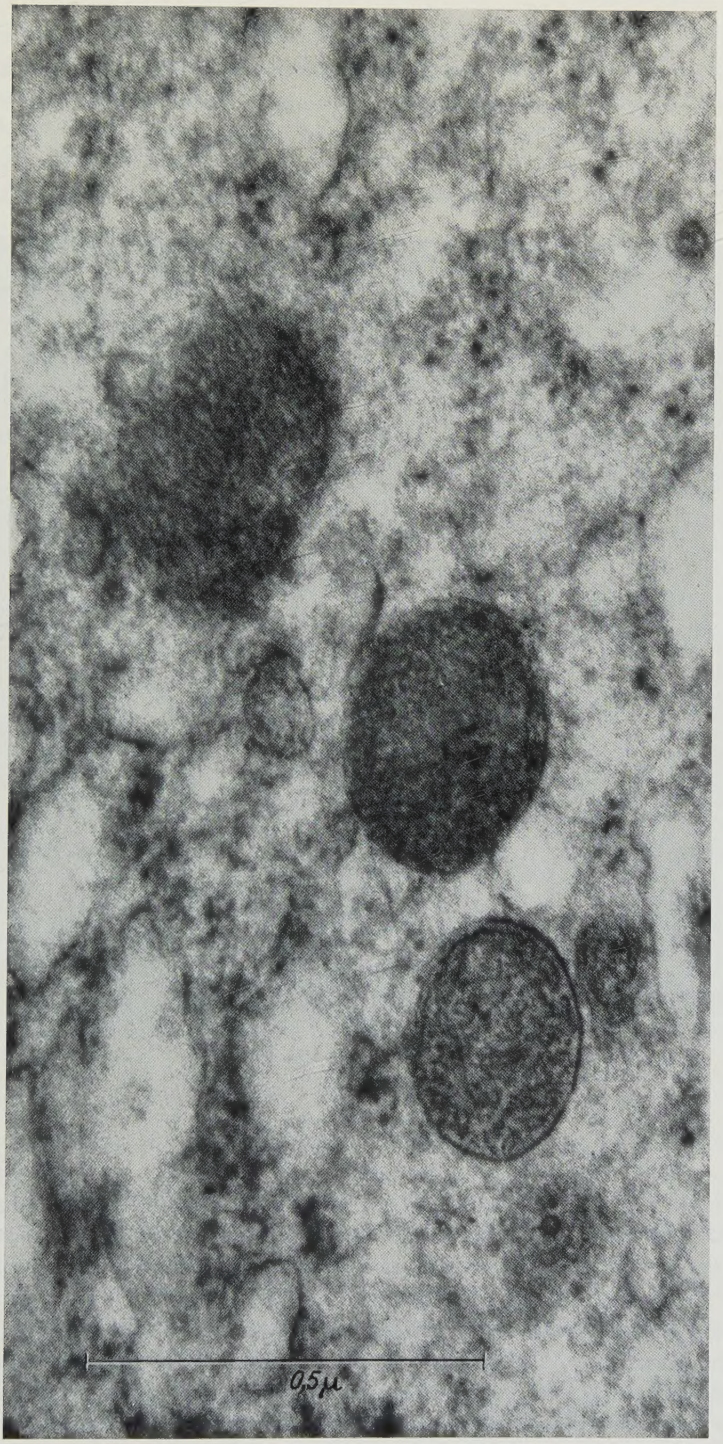

Fig. 2. The upper of the three dense bodies has a somewhat indefinite outline. The middle one is well-circumscribed and shows evidence of a single-layered limiting membrane. The lower one contains a second dense layer internal to the first, so that the dense body has an almost complete double membrane surrounding it. Thus, as far as the limiting membrane goes, the three dense bodies lie in a sequence of increasing organization. All three bodies consist of dense granular material ($\times$ 104 000)

Findings

It was observed that the cytoplasm of the motor neurones of both sides contained dense bodies. Their frequency in normal neurones was estimated as approximately one quarter that of the profiles of mitochondria. They were not confined to any particular region of the cytoplasm and they were not exclusively related to the nuclear membrane, the plasma membrane, nor to the Golgi zone.

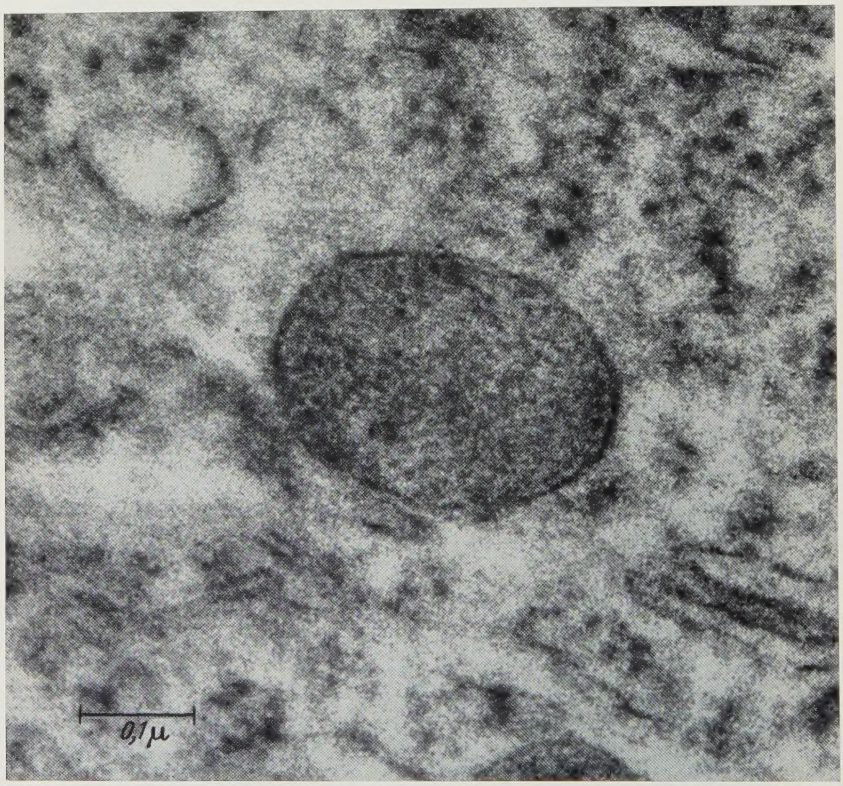

Fig. 3. This dense body appears to be very similar to the lowest of the dense bodies shown in Fig. 2. It has a granular structure and a double-layered limiting membrane, although the inner of the two layers may not be complete. In places, the alignment of granules is rather suggestive of double membrane structure (× 149000)

Dense bodies were often found in close association with one another or with mitochondria. They were characteristically round or slightly oval in shape, their largest diameter being approximately 0,4 microns. Examination of a large number of these structures showed that there were considerable differences between different dense bodies. The simplest forms were granular in structure, had a ragged outline and possessed no definite limiting membrane. Others were well-circumscribed and possessed a limiting membrane with either one or two electron-dense layers, the inner layer in some cases being incomplete. In the dense bodies which possessed a limiting membrane, there were varying degrees of internal organization. In some, there was a simple granular structure; in others, the granules showed an alignment suggestive of a double membrane structure; in yet others, definite double membranes were present. In some of the more highly organized

dense bodies, an electron-transparent area was evident, and these dense bodies were very similar in appearance to mitochondria. Some of the different forms of dense body are illustrated in Figs. 1—7 in a sequence of increasing organization; a normal mitochondrion is ilustrated in Fig. 8. The proximity of membranes of the endoplasmic reticulum gave rise, in some instances, to a false appearance of an extra limiting layer of electron dense material on one or more aspects of a dense

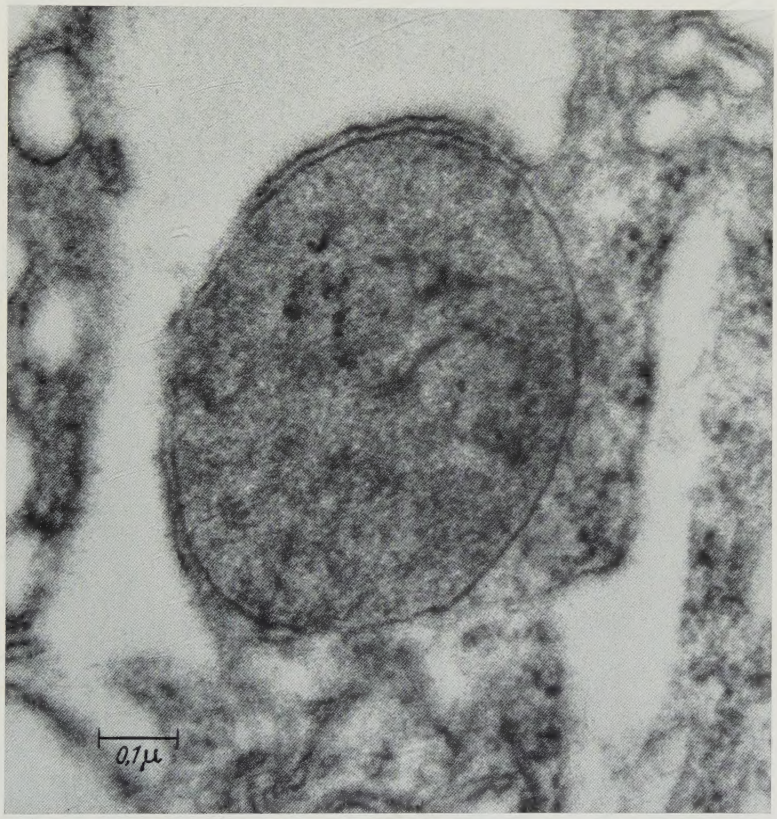

Fig. 4. This dense body shows more definite evidence of internal organization than Fig. 3. Incomplete double membranes can be identified. In addition, note the very fine, dark particles within the dense body. The whole structure is indenting a large vesicle of the endoplasmic reticulum which gives rise to a false appearance of an extra dense layer to the outer limiting membrane along one aspect of the dense body (× 105000)

body or mitochondrion (Figs. 4, 9). Amongst the occasional features, one must also mention the very fine dark particles, somewhat smaller than cytoplasmic RNA particles, which were occasionally seen within the substance of a dense body (Fig. 4). Very infrequently, a dense core, similar to that observed by ROUILLER and BERNHARD (1956) in the microbodies of the liver, or the appearance of concentric lamellae were noted in the substance of a dense body.

In the animals which had been subjected to unilateral hypoglossal neurotomy 10—11 days before, the neurones of the operated side contained more mitochondrial profiles per unit area of cytoplasm than did the neurones of the control side. The average number of mitochondrial profiles per print was 46 (± standard devia-

tion of 21) on the operated side and 36 (± 14) on the control side, the difference being significant at the 0,01 level of probability ($t = 2{,}7$). Counts of dense bodies on the same micrographs gave the following results: the average count of dense

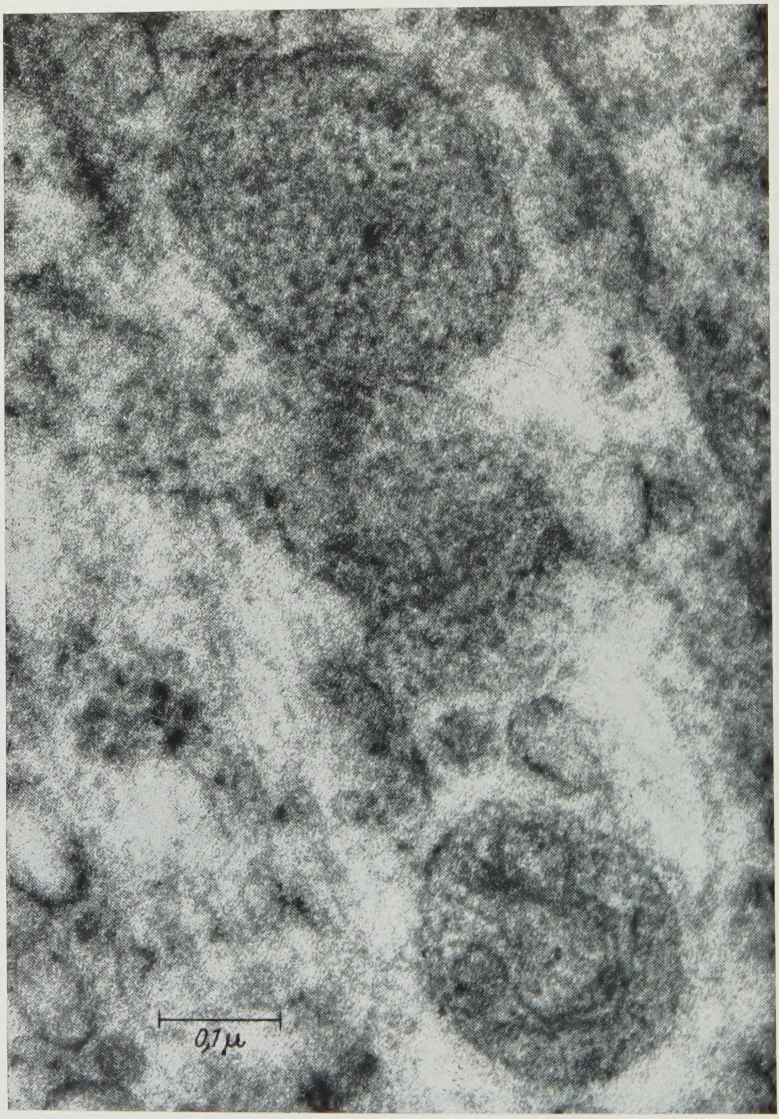

Fig. 5. The lowest of the three dense bodies shows a greater degree of internal organization than that shown in Fig. 4. Its somewhat smaller size may be due to tangential sectioning. The upper of the three dense bodies is similar to that shown in Fig. 3 while the middle one, with its indefinite outline, is similar to the first dense body illustrated in Fig. 1 (× 165 000)

bodies per print was 16 (± 10) on the operated side and 10 (± 6) on the control side, the difference between the two being significant at the 0,01 level ($t = 3{,}6$).

Discussion

The electron microscopic appearances of dense bodies in the neurones of the hypoglossal nucleus, seemed consistent with the possibility that different forms of

dense body represent stages leading to or from mitochondria. Although the morphological appearances were very suggestive, it is of course not possible, on these grounds alone, to conclude that such a developmental relationship exists. These

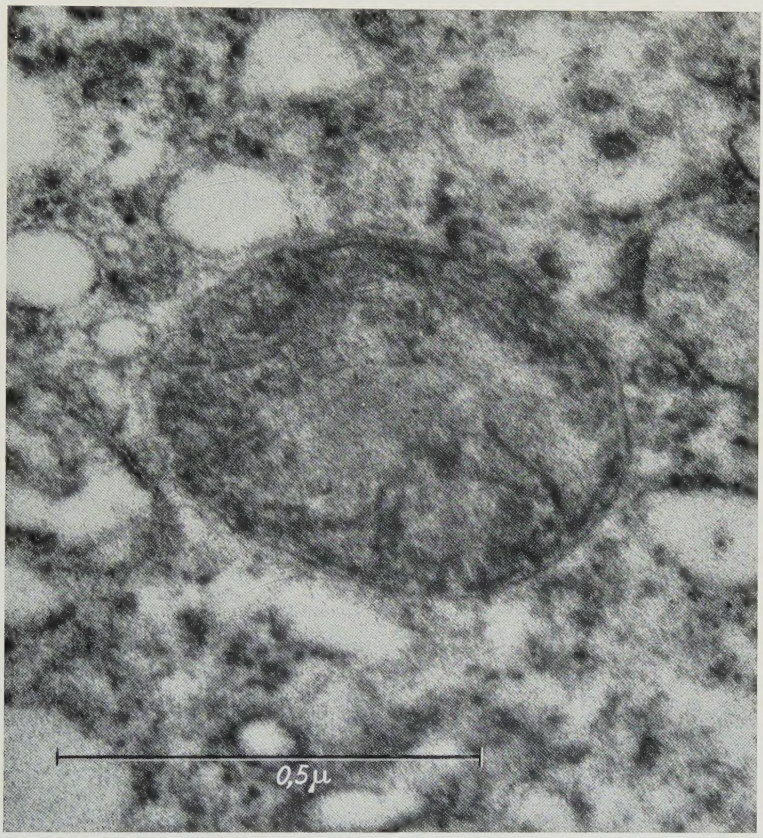

Fig. 6. This dense body has a double-layered limiting membrane and shows internal organization to an even greater degree than the lowest dense body in Fig. 5. In addition, it possesses areas of electron-transparency. There are definite similarities between this structure and a mitochondrion (× 110000)

observations do, however, confirm and extend the earlier observations of Rouiller and Bernhard (1956) and Rouiller (1957) who noted membrane-containing microbodies in liver cells and those of Belt (1958) who noted similar appearances in cells of the adrenal cortex. Schulz (1958) made similar observations in a study of cytosomes in human pulmonary alveolar macrophages. It was these authors who first advanced the hypothesis that mitochondria may form from microbodies. The results of the counts carried out on the micrographs in the present study supply additional evidence for a relationship between dense bodies and mitochondria. They confirm the earlier observations (Hartmann 1948, 1954) that the number of mitochondrial profiles was increased 10—11 days after axon section, and in addition show that there was an associated increase in the number of dense bodies. Assuming that the increased numbers of mitochondria were brought about by the active formation of new organelles, one might interpret the associated increase in dense body count as evidence that dense bodies play a role in mitochondrial formation. It would seem permissible to regard the increase in mito-

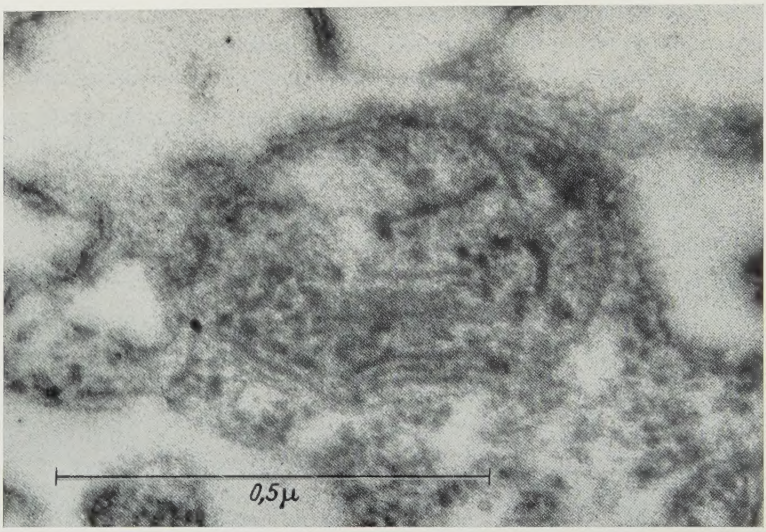

Fig. 7. This dense body shows features similar to those in Fig. 6. There is a considerable amount of unorganized granular material present but the double membranes and areas of electron-transparency may be readily identified (× 113000)

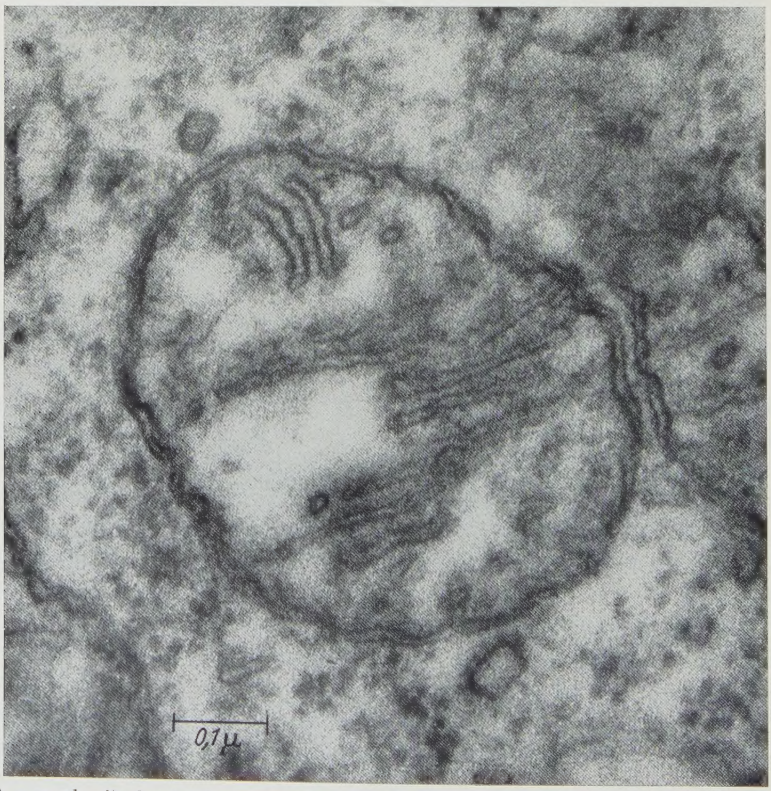

Fig. 8. A normal mitochondrial profile. Normal features of the limiting membrane and cristae are shown (× 119000)

chondrial count as representing new formation, probably reflecting the need for increased metabolic activity in axon regeneration. It would appear to be somewhat parallel to the increase in mitochondrial numbers noted by LEVER (1956) in the cells of the adrenal cortex after treatment of hypophysectomized rats with ACTH. The possibility that, in the present observations, the different forms of dense body represented end-products of mitochondrial degeneration or transformation, seems less likely. The appearances were quite unlike those described for

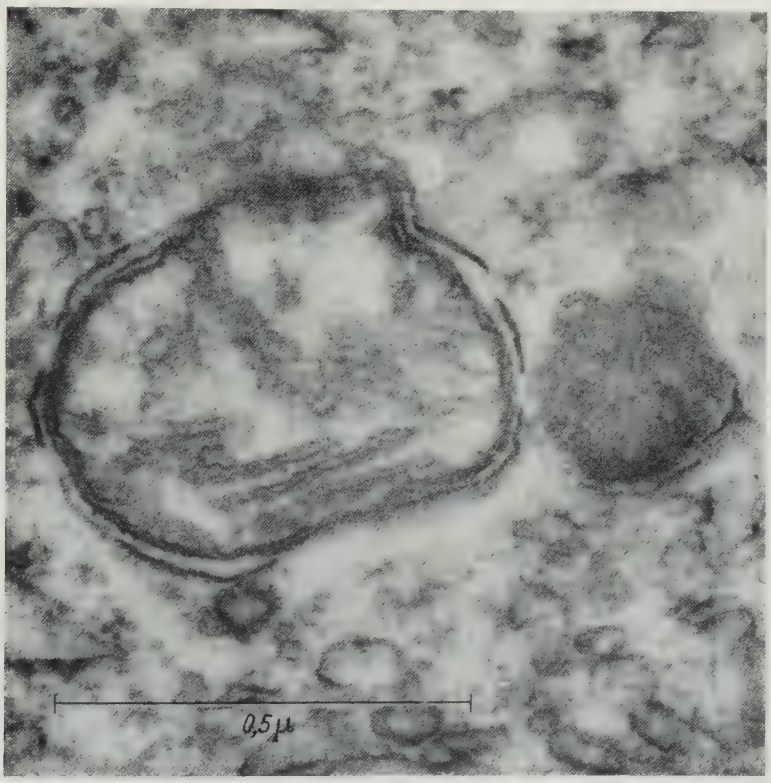

Fig. 9. This mitochondrion is closely invested by membranes of the endoplasmic reticulum which give the false appearance of an extra dense layer in the outer limiting membrane. This illustrates the close relationship often seen between membranes of the endoplasmic reticulum on the one hand and mitochondria and dense bodies on the other (× 107 000)

mitochondrial degeneration by ROUILLER (1957) and others, where the degeneration was associated with mitochondrial swelling. Our own experience with chromatolytic cells is in accord with the latter concept. If the interpretation suggested above is correct, the various forms of dense body shown in Figs. 1—7 represent stages in the formation of small mitochondria. The larger mitochondria could then be formed by simple growth or by fusion of smaller ones. The latter process has been described in light microscopy of tissue culture preparations (TOBIOKA and BIESELE 1956). Such an interpretation of the present observations would not, of course, exclude the possibility of other mechanisms of mitochondrial formation, although no evidence was found here in their support. Postulated mechanisms include self-reproduction (MILLER 1953, FAWCETT 1955, LEON and

Cook 1956), and origin from Golgi membranes (Lever 1956 b), from cytoplasmic vesicles (Gey, Shapras and Borysko 1954, Wohlfarth-Bottermann 1957) and from the nuclear membrane (Causey and Hoffman 1955, Hoffman and Grigg 1958, Brandt and Pappas 1959).

It is also possible that dense bodies have other relationships in addition to a relationship to mitochondria. In the studies of Belt (1958), to which reference has already been made, some microbodies were observed to contain granules or droplets which were presumed to be lipid in nature. On this evidence, the latter author postulated that microbodies could also give rise to liposomes. Although similar dense bodies, containing relatively large areas of even greater density, were not a feature of the present observations, they were noted in unpublished studies in the hypoglossal neurones of the rat. Whatever their constitution, these very dense areas suggest that there may be biochemical differences between different dense bodies. In that event, the possibility that some dense bodies may be related to, if not identical with, lysosomes (de Duve et al. 1955, Novikoff et al. 1956) would not seem to be incompatible with the developmental relationship between dense bodies and mitochondria put forward here. Further study of this point may be merited.

Summary

An electron microscopic study was made of the *hypoglossal nuclei* in a series of rabbits which had been subjected to unilateral hypoglossal neurotomy. Particular attention was given to the dense bodies which were present in the cytoplasm of the motor neurones on both sides. The simplest forms of dense body showed a granular structure without a limiting membrane. Others showed a limiting membrane (with either one or two dense layers) and varying degrees of internal organization in the form of double membranes. Some of the more highly-organized dense bodies possessed electron-transparent areas and were very similar in appearance to mitochondria. The appearances seemed consistent with the possibility that different forms of dense body represented developmental stages leading to or from mitochondria.

Counts made on micrographs confirmed that mitochondrial numbers were increased 10—11 days after axonal section and showed in addition that there was an associated increase in the number of dense bodies. These findings are interpreted as evidence in favour of the developmental relationship of dense bodies to mitochondria.

References

Appelmans, F., R. Wattiaux and C. de Duve: Tissue fractionation studies. 5. The association of acid phosphatase with a special class of cytoplasmic granules in rat liver. Biochem. J. **59**, 438—445 (1955).

Belt, W. D.: The origin of adrenal cortical mitochondria and liposomes. A preliminary report. J. biophys. biochem. Cytol. **4**, 337—340 (1958).

Brandt, P. W., and G. D. Pappas: Mitochondria. II. The nuclear-mitochondrial relationship in Pelomyxa carolinensis Wilson (Chaos chaos L.). J. biophys. biochem. Cytol. **6**, 91–96 (1959).

Causey, G., and H. Hoffman: Cytoplasmic synthesis in nerve cells. Brit. J. Cancer **9**, 666–673 (1955).

Duve, C. de, B. C. Pressman, R. Gianetto, R. Wattiaux and F. Appelmans: Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns in rat-liver tissue. Biochem. J. **60**, 604—617 (1955).

Fawcett, D. W.: Observations on the cytology and electron microscopy of hepatic cells. J. nat. Cancer Inst. **15**, Suppl., 1475—1502 (1955).

Fernández-Morán, H.: A diamond knife for ultrathin sectioning. Exp. Cell Res. **5**, 255—256 (1953).

Gey, G. O., P. Shapras and E. Borysko: Activities and responses of living cells and their components as recorded by cinephase microscopy and electron microscopy. Ann. N.Y. Acad. Sci. **58**, 1089—1109 (1954).

Hartmann, J. F.: Mitochondria in nerve cell bodies following section of axones. Anat. Rec. **100**, 49—60 (1948).

— Electron microscopy of motor nerve cells following section of axones. Anat. Rec. **118**, 19—34 (1954).

Hoffman, H., and G. W. Grigg: An electron microscopic study of mitochondria formation. Exp. Cell Res. **15**, 118—131 (1958).

Latta, H., and J. F. Hartmann: Use of a glass edge in thin sectioning for electron microscopy. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **74**, 436—439 (1950).

Leon, H. A., and S. F. Cook: Mitochondrial self-duplication observed in vitro. Science **124**, 123—124 (1956).

Lever, J. D.: Cytological studies on the hypophysectomized rat adrenal cortex: the alterations in its fine structure following ACTH administration and on lowering the Na/K ratio. Endocrinology **58**, 163—180 (1956a).

— Physiologically induced changes in adrenocortical mitochondria. J. biophys. biochem. Cytol. **2**, Suppl., 313—318 (1956b).

Miller, R. A.: The relation of mitochondria to secretory activity in the fascicular zone of the rat's adrenal. Amer. J. Anat. **92**, 329—359 (1953).

Novikoff, A. B., H. Beaufay and C. de Duve: Electron microscopy of lysosome-rich fractions from rat liver. J. biophys. biochem. Cytol. **2**, Suppl., 179—184 (1956).

Palay, S. L., and G. E. Palade: The fine structure of neurons. J. biophys. biochem. Cytol. **1**, 69—88 (1955).

Rouiller, C.: Contribution de la microscopie électronique à l'étude du foie normal et pathologique. Ann. anat. path. **2**, 548—562 (1957).

—, and W. Bernhard: "Microbodies" and the problem of mitochondrial regeneration in liver cells. J. biophys. biochem. Cytol. **2** Suppl., 355—359 (1956).

Schulz, H.: Die submikroskopische Pathologie der Cytosomen in den Alveolarmakrophagen der Lunge. Beitr. path. Anat. **119**, 71—91 (1958).

Sjöstrand, F. S., and J. Rhodin: The ultrastructure of the proximal convoluted tubules of the mouse kidney as revealed by high resolution electron microscopy. Exp. Cell Res. **4**, 426—456 (1953).

Tobioka, M., and J. J. Biesele: Mitochondria in living cells: an analysis of movements. J. biophys. biochem. Cytol. **2**, Suppl., 319—324 (1956).

Wohlfahrth-Bottermann, K. E.: Cytologische Studien IV. Die Entstehung, Vermehrung und Sekretabgabe der Mitochondrien von Paramecium. Z. Naturforsch. **12**b, 164—167 (1957).

George Hudson, B. Sc. M. D., Department of Anatomy, University of Minnesota, Minneapolis 14, Minnesota, U.S.A.

Zeitschrift für Zellforschung 54, 158—166 (1961)

Department of Anatomy, The Medical School, King's College, Newcastle upon Tyne, England

NERVE SUPPLY AND DISTRIBUTION OF CHOLINESTERASE ACTIVITY IN THE EXTERNAL NOSE OF THE MOLE*

By

N. Cauna and P. Alberti

With 12 Figures in the Text

(Received December 29th, 1960)

Contents

Page

I. Introduction 158
II. Material and methods 158
III. Observations 159
1. Neurohistological findings 159
2. Distribution of cholinesterase activity 161
IV. Discussion and conclusions 163
Summary 165
References 166

I. Introduction

The projecting nose of quadrupeds has evolved into a cutaneous sense organ comparable with the human finger in many ways (Wood Jones 1920). In the common mole *(Talpa europaea)*, the hairless skin of the nose shows a remarkable structure and an extraordinary richness of nerve supply—a condition that has apparently evolved in compensation for loss of vision in the burrowing animal.

First described by Eimer (1871) the nerve supply of the nose of the mole was subsequently investigated by prominent anatomists of that time (Moisisovicz 1876, Merkel 1880, Ranvier 1880, Bielschowsky 1907), but little work has been done in recent years (Boeke 1940, Cauna 1959). The distribution of cholinesterase activity of this sensory area has not yet been described.

The mole's nose is of particular interest to the modern investigator, since it provides ideal material for electron microscopical studies of intra-epidermal nerve endings. These are concentrated in easily identifiable areas known as organs of Eimer. The preterminal nerve segments of the intraepidermal endings can also be easily located and their morphological changes can be traced in serial sequence.

The purpose of this study is to collect detailed information by the use of optical methods for a subsequent electron microscopical work.

II. Material and methods

The material consists of two moles aged approximately two weeks, and five fully grown animals. They were killed by chloroform, and small pieces of the external nose were fixed immediately in neutral 10% formalin solution, using sodium acetate as a buffer. Specimens intended for neurohistological work were left in the fixative for several days and then serial sections were cut parallel and perpendicular to the skin surface. They were stained by a simplified Bielschowsky-Gross silver impregnation method (Cauna 1959). Tissues intended

* We gratefully acknowledge the technical assistance of Miss Jill Hocknell. Our thanks are also due to Mr. C. J. Duncan and the staff of the Photography Department for their aid with the photographic work. We are particularly grateful to Mr. D. Burgess of the Ministry of Agriculture and Fisheries for kindly supplying us with live moles. One of the authors (N.C.) acknowledges an equipment grant from the Royal Society.

for histochemical work were fixed for 30 minutes to 4 hours at 5°C. Frozen sections 20 μ to 30 μ in thickness were cut and collected in distilled water, washed for 30 minutes and then incubated with a substrate from one to 22 hours at 37°C using the histochemical technique of KOELLE (1951, 1955) or its modification (SNELL 1959). The p_H of the substrates was adjusted to 5.3 (acetate buffer) in order to reduce diffusion artifacts. Eserine controls were used with both substrates, and these always showed a negative reaction.

III. Observations

1. Neurohistological findings

The extraordinary concentration of nerve fibres in the nose of the mole can best be seen in sections of the corium cut parallel to the skin surface (Fig. 1).

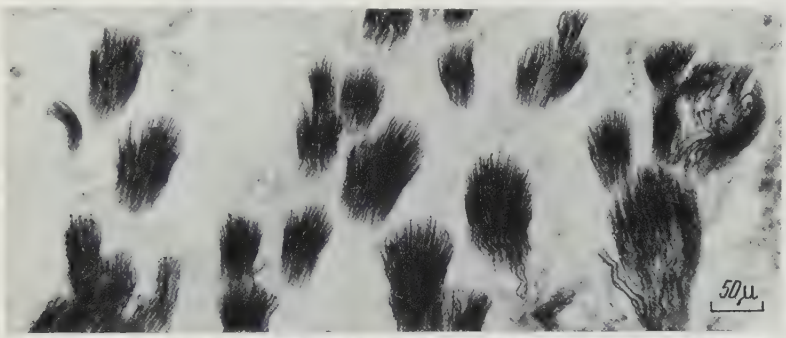

Fig. 1

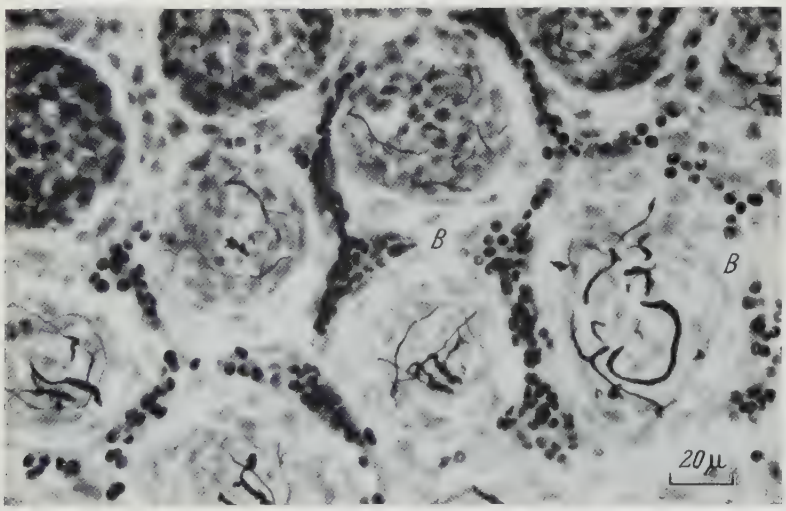

Fig. 2

Fig. 1. Hairless skin of the mole's nose cut through the corium parallel to the surface, showing fascicles of thick medullated axons proceeding to the epidermis. Mole, 2 weeks old. Simplified Bielschowsky-Gross silver method. Frozen section, 20 μ. ×140

Fig. 2. Hairless skin of the mole's nose cut through the superficial layer of the corium showing nerve plexuses deep to EIMER's organs and blood sinuses (*B*) surrounding EIMER's organs. Mole, 2 weeks old. Simplified Bielschowsky-Gross silver method. Frozen section, 20 μ. ×400

Such sections reveal closely packed fascicles of medullated axons ranging in diameter from just under 2 μ to 4 μ. As the large fascicles proceed towards the epidermis they split progressively into smaller bundles, and at the same time exchange nerve fibres in a plexiform manner. Just before reaching the epidermis

each terminal nerve bundle becomes intimately associated with an epidermal unit known as the organ of Eimer (Fig. 11).

Eimer's organs can be recognised on the surface of the hairless nose as spherical elevations each approximately 100 μ in diameter. Each elevation is continuous

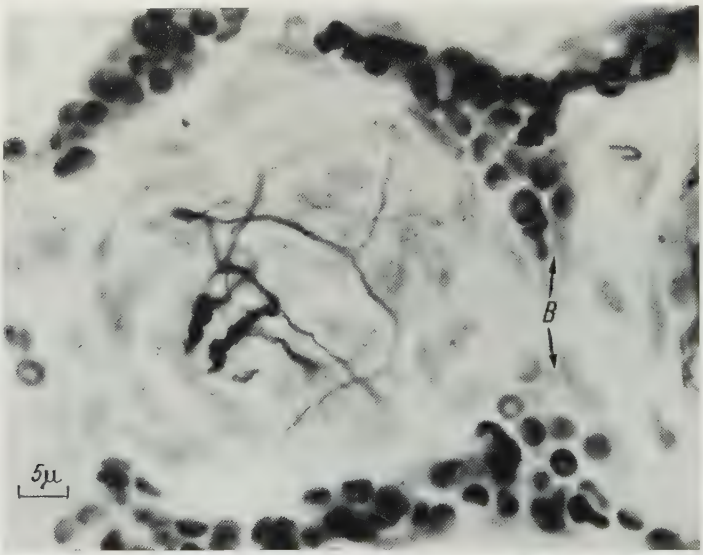

Fig. 3

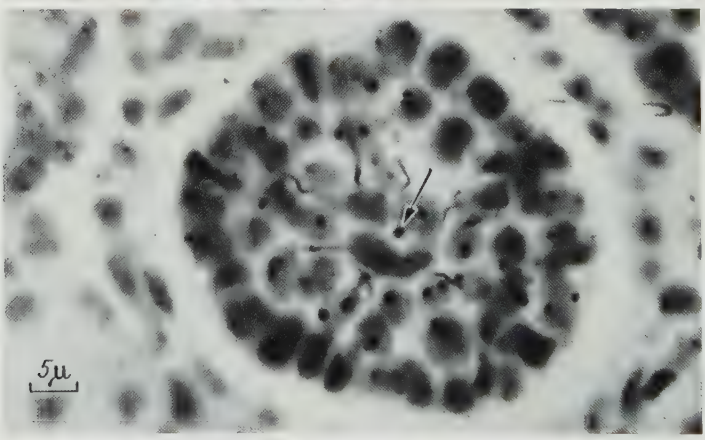

Fig. 4

Fig. 3. Nerve plexus and blood sinus (*B*) of Eimer's organ (see plane Fig. 10). The nerve fibres are embedded in a mass of cells recognizable by their lightly staining nuclei. Mole, 2 weeks old. Simplified Bielschowsky-Gross silver method. Frozen section, 20 μ. ×1200

Fig. 4. Transverse section of Eimer's organ (see plane in Fig. 10) showing a single nerve fibre (arrow) surrounded by the cells of the central core and a set of fine fibres related to the periphery of the core cells (cf. with Figs. 6, 7, and 11). Mole, 2 weeks old. Simplified Bielschowsky-Gross silver method. Frozen section, 20 μ. ×1200

with a blunt cylindrical process of the epidermis, 60—80 μ in diameter which projects into the corium (Figs. 10 and 11). The spaces between the processes contain a network of thin walled veins or large capillaries. These vessels are inconspicuous when empty, but when filled with blood they surround the corial portions of Eimer's organs (Figs. 2 and 3), in much the same way as blood sinuses surround the shafts of sinus hairs.

Axons approaching the organs of EIMER from underneath lose their myelin sheaths while 50—100 μ from the epidermis, but they remain invested by the Schwann sheaths. Before reaching the epidermis, most of them divide several times forming a nerve plexus which expands horizontally deep to the basal cell layer (Figs. 2, 3 and 11). As this happens the Schwann cells increase in number and become irregularly arranged, filling the intervals between the nerve fibres (Figs. 3 and 11). In some sections cut in the plane of the plexus through the basal cell layer of EIMER's organ, it is possible to trace the origin of the plexus from the stem axons and to fallow the course of the nerve fibres until they enter the epidermis. Such studies reveal that the fibres of the plexus do not produce defined terminals such as Merkel's discs, Pacinian and Rufini corpuscles, but they all give origin to intra-epidermal endings. After entering the base of EIMER's organ they ascend vertically towards the surface reaching the stratum corneum where they gradually end in fading filaments (Fig. 5).

Fig. 5. Longitudinal section of EIMER's organ showing the intra-epidermal nerve endings traversing the stratum spinosum and ending in the stratum corneum. Adult mole. Simplified Bielschowsky-Gross silver method. Frozen section, 20 μ. ×1200

The intra-epidermal nerve fibres are not evenly distributed throughout the organ of EIMER, but most of them are related to a central core of cells which can best be seen in transverse sections (Figs. 4 and 6—8). A single thicker nerve fibre enters the centre of the core and ascends along a tunnel formed by the core cells (arrow in Fig. 4). The remaining finer fibres which are up to 20 and more in number surround the periphery of the central core (Fig. 4, cf. with Fig. 11). The exact relationship of the intra-epidermal nerve fibres to the core cells of EIMER's organ is best seen in sections stained for cytoplasm (Figs. 6—8). The nerve fibres do not occupy the intercellular spaces (*S* in Figs. 6, 7 and 8), but they are embedded in surface grooves of the core cells. Earlier studies of intra-epithelial nerves in various species of animals using maceration and micro-dissection methods, have shown that nerve fibres are firmly attached to the cell membranes of the related cells (CAUNA 1959). As a result, such endings grow continuously towards the surface together with the epidermis and undergo atrophy on reaching the horny layer (Figs. 5 and 8).

2. Distribution of cholinesterase activity

Sections of the skin of the nose incubated with butyryl substrate, give a negative cholinesterase reaction even after a period of 21 hours (Fig. 10). After

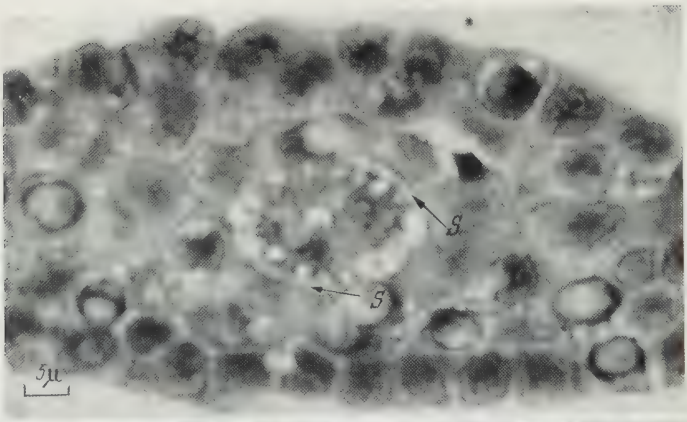

Fig. 6

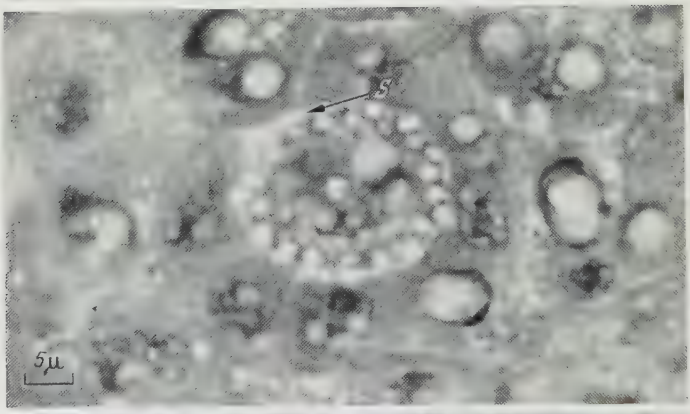

Fig. 7

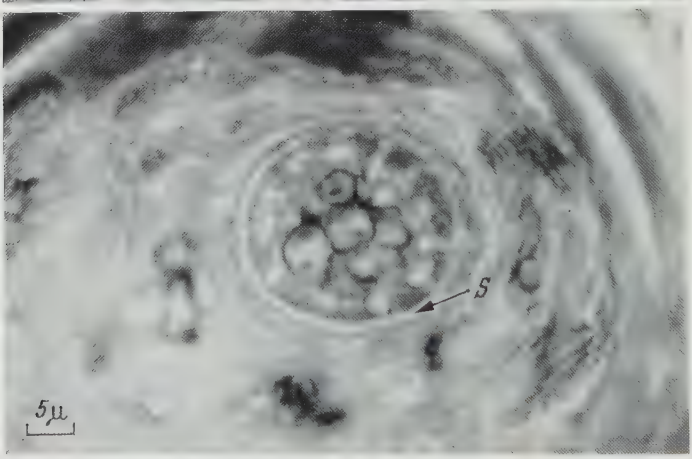

Fig. 8

Figs. 6—8. Transverse sections of Eimer's organ showing the central core of cells and the situation of the intraepidermal nerve endings. Nerve fibres do not occupy the inter-cellular spaces (*S*), but they are accommodated in surface grooves of the core cells. Fig. 6—section through the germinal layer. Fig. 7—section through the deeper stratum corneum: inter-cellular spaces and cell nuclei are disappearing. Fig. 8—section through the superficial stratum corneum. Adult mole. Harris' haematoxylin and eosin, 7 μ. $\times 1200$

incubating with acetyl substrate, the corial nerves, the plexus area of Eimer's organs and the intra-epidermal nerve endings give a distinct positive reaction

(Fig. 9). In the hairy skin of the nose, the motor end plates, the nerve plexuses surrounding the hairs, including those of the sinus hairs and the musculi arrectores pilorum also give a positive reaction, but the sebaceous glands remain negative.

In the hairless skin, the stain is particularly intense at the bases of EIMER's organs. In order to study the localization of the enzyme activity in these areas, some sections were embedded in paraffin after incubation with acetyl substrate,

Fig. 9

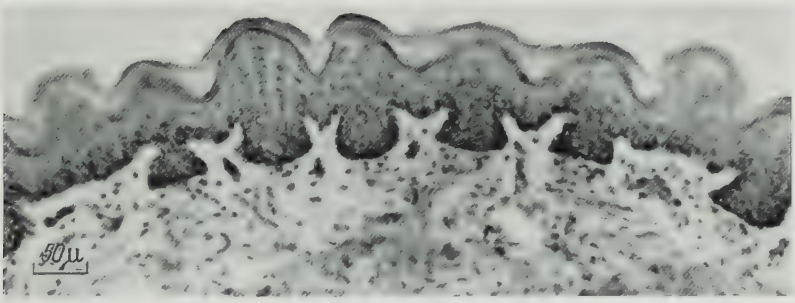

Fig. 10

Fig. 9. Hairless skin of the mole's nose incubated with acetyl substrate for 21 hours and lightly counterstained with Harris' haematoxylin. The corial nerves, the basal plexuses of EIMER's organs and the intra-epidermal nerve fibres give a strong positive reaction. Adult mole. Frozen section, 20 μ. ×140

Fig. 10. Hairless skin of the mole's nose incubated with butyryl substrate for 21 hours and counterstained with Harris' haematoxylin. All tissues give a negative cholinesterase reaction. Adult mole. Frozen section, 20 μ. ×140

cut serially and counterstained (Fig. 12). Such sections show that in the epidermis, the nerve endings contain the enzyme, but the associated cells of the central core are negative. In the plexus region, the nerve fibres as well as the associated cells appear to be positive (cf. Figs. 11 and 12).

IV. Discussion and conclusions

As a result of this investigation some new anatomical features have been found, and certain findings of earlier investigators have been rejected. It was found that EIMER's organ was surrounded by a blood sinus (Fig. 3) and that all nerve fibres of the basal plexus ultimately became intra-epidermal endings. Contrary to the findings of earlier investigators (RANVIER 1880, BIELSCHOWSKY 1907, BOEKE 1940) in the present study MERKEL's discs, Pacinian corpuscles and Ruffini corpuscles were not observed at the base of EIMER's organ; instead it was found that the Schwann sheath cells of the plexus increased in number, underwent

modification and gave a positive cholinesterase reaction (Figs. 11 and 12). The appearance of the modified Schwann cells in the plexus and the relationship of these cells to the nerve fibres is not unlike that found in corpuscular receptor organs. Indeed, these cells are very similar in appearance to those found in the central core or the inner bulb of digital Pacinian corpuscles (Cauna and Mannan

Fig. 11

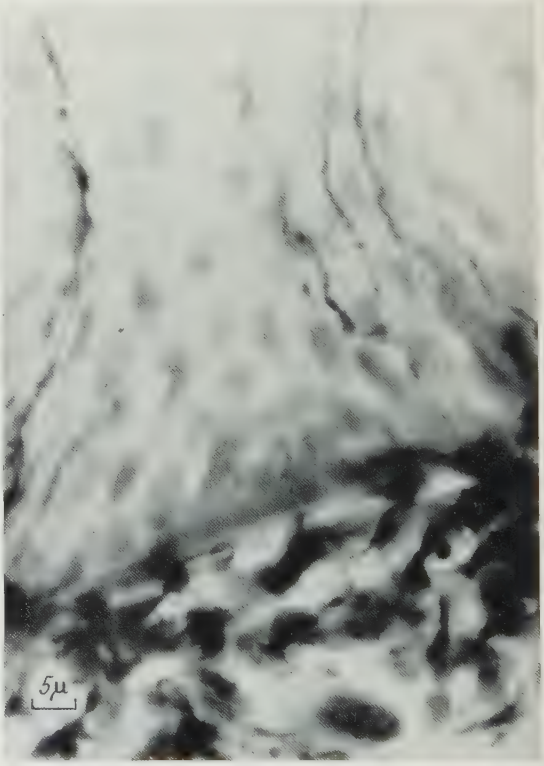

Fig. 12

Fig. 11. Longitudinal section of Eimer's organ and its nerves. The base of the organ is associated with a complex nerve plexus which is embedded in a mass of cells and which gives origin to intra-epidermal endings. Adult mole, Bielschowsky-Gross silver impregnation. Frozen section, 20 μ. ×600

Fig. 12. Longitudinal section of Eimer's organ incubated with acetyl substrate for 8 hours and lightly counterstained with Harris' haematoxylin. The intra-epidermal nerve fibres give a positive reaction, but the related cells of the central core are negative. In the plexus region, the nerve fibres as well as the associated cells appear to be positive. Adult mole. Frozen section, cut serially after incubation, 7 μ. ×1200

1958, 1959), or in the corial end of Meissner's corpuscles (Cauna 1958), which cells are also derived from lemmocytes. Furthermore, the cells of the basal nerve plexus contain cholinesterase, as it is the case with Pacinian and Meissner's corpuscles (Cauna 1960, 1961). These findings gain significance when considered in connection with the general organisation of Eimer's organs. Each of them is so designed that a mechanical stimulus applied to the surface will be transmitted to the plexus underneath by leverage facilitated by the blood sinus. This principle of transmission is well recognized in the tactile hair, and a similar mechanism is found in the human palmar and digital skin, in which case the intermediate

or sweat ridge of the papillary ridge moves as a lever when the surface of the epidermis is deformed (Cauna 1954).

While it appears that the organ of Eimer together with its specialized nerve plexus and the surrounding blood sinus is designed to serve a tactile function, the role of the intraepidermal endings seems to be obscure. Their situation is unfavourable for tactile stimulation: Eimer's organs are relatively solid units hinged together by thin pliable epidermis (Figs. 9 and 10). Consequently, the obvious situation for additional touch receptors would be beetwen, rather than within Eimer's organs. In view of this, it appears that the intra-epidermal endings of the mole's nose may serve sensory modality other than touch. The dermal papillae between Eimer's organs are almost devoid of nerve endings, and no obvious receptors can be recognised suitable for pain and temperature reception. By situation, the intra-epidermal endings are exposed to temperature changes as well as to painful stimuli encountered in search of food, so they are well suited as pain and temperature receptors. But since they are continuous with the nerve fibres of the basal plexus, this suggestion would mean that one and the same nerve fibre acts as pain, temperature and touch receptor at different segments along its length. It would also mean that the different sensory modalities are carried to the brain along one and the same medullated axon (not necessarily at the same time). Whether this is the case, remains a problem for further investigation. But there is some experimental evidence in support of the above suggestion. After a series of electrophysiological experiments on human and animal nerves, Weddell and his associates (Weddell 1960) came to a conclusion that nerve fibres may not be modality-specific in certain situations, and that the distinction of modalities may be based on different patterns of spike potentials, reaching the central nervous system along the same set of nerve fibres.

Summary

Nerve supply and the distribution of cholinesterase activity were studied in the skin of the external nose of seven moles using a simplified Bielschowsky-Gross silver method and Koelle's histochemical technique.

The sensory units of the mole's nose or the organs of Eimer are surrounded by blood sinuses which facilitate their movements during mechanical stimulation. All nerve fibres of the plexus deep to the basal cell layer of Eimer's organ ultimately become intra-epidermal endings. Contrary to the findings of earlier investigators, Merkel's discs, Pacinian corpuscles and Ruffini corpuscles have not been observed at the base of Eimer's organ. In the superficial layer of the plexus, the Schwann sheath cells increase in number, undergo modification and give a positive cholinesterase reaction.

It is suggested that the organ of Eimer, the specialised nerve plexus deep to it and the surrounding blood sinus together constitute the touch receptor on a similar principle of transmission by leverage as in the tactile hair or the intermediate ridge of the papillary ridge.

The role of the intra-epidermal nerve endings of the mole's nose as tactile receptors is disputed. A suggestion is made that tnese nerves may constitute pain and temperature receptors and that several modalities of sensation may be carried to the brain along one and the same medullated axon.

References

Bielschowsky, M.: Über sensible Nervenendigungen in der Haut zweier Insectivoren. (Talpa europaea und Centetes ecaudatus.) Anat. Anz. **31**, 187—194 (1907).

Boeke, J.: Problems of nervous anatomy, p. 12—17. London: Oxford University Press 1940.

Cauna, N.: Nature and functions of the papillary ridges of the digital skin. Anat. Rec. **119**, 449—468 (1954).

— Structure of digital touch corpuscles. Acta anat. (Basel) **32**, 1—23 (1958).

— The mode of termination of the sensory nerves and its significance. J. comp. Neurol. **113**, 169—210 (1959).

— The distribution of cholinesterase in the cutaneous receptor organs, especially touch corpuscles of the human finger. J. Histochem. Cytochem. **8**, 367—375 (1960).

— Cholinesterase activity in cutaneous receptors of man and of some quadrupeds. Bibl. anat. (Basel) **2**, 86—96 (1961).

—, and G. Mannan: The structure of human digital Pacinian corpuscles (corpuscula lamellosa) and its functional significance. J. Anat. (Lond.) **92**, 1—20 (1958).

— — Development and postnatal changes of digital Pacinian corpuscles (corpuscula lamellosa) in the human hand. J. Anat. (Lond.) **93**, 271—286 (1959).

Eimer, Th.: Die Schnauze des Maulwurfes als Tastwerkzeug. Arch. mikr. Anat. **7**, 181—191 (1871).

Koelle, G. B.: The elimination of enzymatic diffusion artifacts in the histochemical localization of cholinesterases, and a survey of their cellular distribution. J. Pharmacol. exp. Ther. **103**, 153—171 (1951).

— The histochemical identification of acetylcholinesterase in cholinergic, adrenergic and sensory neurons. J. Pharmacol. exp. Ther. **114**, 167—184 (1955).

Merkel, Fr.: Über die sensiblen Nervenendigungen in der Haut der Wirbeltiere, S. 165. Rostock: Verlag der Stillerschen Hof- und Universitäts-Buchhandlung 1880.

Moisisovicz, A. v.: Über die Nervenendigungen in der Epidermis der Säuger. S.-B. Wien. Akad. **73**, 69—81 (1876).

Ranvier, L.: On the termination of nerves in the epidermis. Quart. J. micr. Sci. **20**, 456—458 (1880).

Snell, R. S.: The histochemical appearances of cholinesterase in the parotid salivary gland of the rat. Z. Zellforsch. **49**, 330—338 (1959).

Weddell, G.: Studies related to the mechanism of common sensibility. In: Advances in biology of skin. Vol. 1: Cutaneous innervation, p. 112—160. Edit. by W. Montagna. Oxford: Pergamon Press 1960.

Wood Jones, F.: The principles of anatomy as seen in the hand, p. 260—262. London: J. & A. Churchill 1920.

Dr. N. Cauna, Department of Anatomy, King's College, Newcastle upon Tyne 1, England

Dr. P. Alberti, Department of Anatomy, Emory University, Emory, Atlanta, Georgia, U.S.A.

Zeitschrift für Zellforschung 54, 167—181 (1961)

Aus dem Histologisch-Embryologischen Institut der Universität Lausanne, Schweiz
(Direktor: Prof. Dr. Otto Bucher)
in Zusammenarbeit mit dem Zentrum für Elektronenmikroskopie der Universität Lausanne

ZUR ELEKTRONENMIKROSKOPISCHEN UNTERSUCHUNG DER JUXTAGLOMERULÄREN SPEZIALEINRICHTUNGEN DER NIERE

I. Mitteilung

PROBLEMSTELLUNG UND ERSTE BEOBACHTUNGEN*

Von

O. Bucher und E. Reale

Mit 10 Textabbildungen

(Eingegangen am 7. Dezember 1960)

A. Einleitung

Am Gefäßpol der Nierenkörperchen findet sich ein Regulationsapparat, zu dem nach dem Übersichtsreferat von H. Becher (1949) die folgenden Bestandteile gehören (s. auch Abb. 1):

1. „der baulich modifizierte, präglomeruläre Abschnitt der Arteriola afferens mit seinen epitheloiden Zellen (Quellzellen);

2. die Macula densa, das ist der gestaltlich wohlgekennzeichnete Abschnitt des Zwischenstücks des Harnkanälchens, welches sich regelmäßig an den Gefäßpol oder die zugehörige Arteriola afferens des Nierenkörperchens anlagert;

3. die paraportalen oder paravaskulären Zellinseln, welche Aussprossungen aus dem Zwischenstück oder Mittelstück der Harnkanälchen darstellen und neben den arteriellen Gefäßen der Nierenrinde oder unmittelbar am Gefäßpol des Nierenkörperchens gelegen sind;

4. das Sockelplasmodium oder der Goormaghtighsche Zellhaufen, eine durch Kernhäufung gekennzeichnete, im Arteriolenwinkel zwischen der Arteriola afferens und efferens gelegene Bildung."

Von diesen vier Spezialeinrichtungen sind die ersten beiden recht auffällige Bildungen und in den Schnittpräparaten leichter zu sehen als die von N. Goormaghtigh (1932) und H. Becher (1936) beschriebenen Zellgruppen.

Die hellen *epitheloiden Zellen* — die Bezeichnung „Quellzellen" möchten wir lieber meiden, solange eine „Quellfunktion" nicht bewiesen ist (Näheres bei M. Clara 1956) — liegen in der Media der Arteriola afferens, besonders in der Gegend des glomerulären Gefäßpoles; vielfach sind sie nicht gleichmäßig auf den ganzen Gefäßumfang verteilt, sondern auf der einen Seite angehäuft, wo sie dann sog. „Polkissen" (K. W. Zimmermann 1933) bilden. Ihre lichtmikroskopisch faßbare Struktur ist eingehend beschrieben (Lit. z. B. bei G. Schloss 1946, H. Becher 1949, H. W. Smith 1951). Von der *Macula densa* sind schon weniger Einzelheiten bekannt (s. auch O. Bucher und E. Zimmermann 1960), obschon auch sie morphologisch gut definiert ist: Dort wo der gewundene Teil des Mittelstückes sich dem Gefäßpol des Nierenkörperchens anlegt, bildet das Epithel des Kanälchens eine

* Mit Unterstützung durch die Fritz Hoffmann-La Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz.

elliptische Platte, deren Zellen schmäler und höher sind als die des gegenüberliegenden Wandabschnittes (Abb. 1 und 2), und die schon bei mittlerer Vergrößerung durch die Zusammenballung von elliptoiden, oft deutlich nukleolenhaltigen Zellkernen in Erscheinung tritt.

Die von H. Becher beschriebenen *paraportalen Zellgruppen*, die anscheinend durch epitheliale Aussprossung vor allem aus dem Mittelstück entstanden sind, wie auch F. Feyrter (1940) bestätigt hat, sind wesentlich schwerer zu finden. Auch im Schrifttum sind sie nur selten erwähnt, oder dann werden sie mit den Goormaghtighschen Zellhaufen identifiziert (z.B. M. Clara 1938). H. Becher

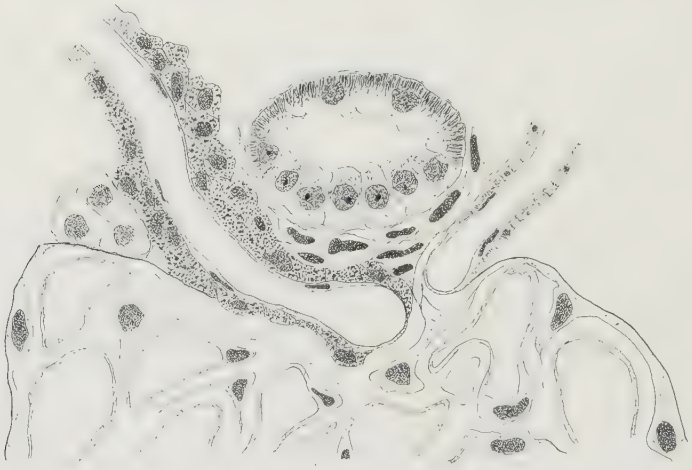

Abb. 1. Schematische Darstellung des juxtaglomerulären Regulationsapparates, in Anlehnung an H. Becher (1949). Im Winkel zwischen der Arteriola afferens (links) — mit ihren epitheloiden Zellen — und der Arteriola efferens (rechts) sieht man den Goormaghtighschen Zellhaufen — mit seinen länglichen Kernen — und darüber die Macula densa. Eine paraportale Zellinsel (Bechersche Zellen) links zwischen der Arteriola afferens und dem Nierenkörperchen (unten im Bild)

(1949) hat sich jedoch ganz einwandfrei davon überzeugen können, daß es sich um zwei verschiedene Zellbildungen handelt. Bei den Goormaghtighschen *Zellhaufen* handelt es sich um mehr oder weniger kegelförmige Gruppen kleiner Zellen, die vorwiegend in dem von der Arteriola afferens und der Arteriola efferens gelegenen Winkel gelegen sind; die Basis des Kegels grenzt an die Macula densa, seine Spitze ragt in das Nierenkörperchen hinein. Die Arteriola afferens kann aber auch mantelartig von diesen Zellen umgeben sein. Am auffälligsten ist im Lichtmikroskop die Anhäufung von elliptoiden, gelegentlich auch abgeplatteten oder stäbchenförmigen Zellkernen mit dichter Chromatinstruktur. H. Becher, der am Vorhandensein von Zellgrenzen zweifelte, führte für den Goormaghtighschen Zellhaufen die neue Bezeichnung „Sockelplasmodium" ein, „da sich die Bildungen vom Gefäßpol aus sockelartig und kegelförmig in das Nierenkörperchen erheben". Ob es sich wirklich um ein Plasmodium (oder um ein Syncytium) oder um eng aneinanderliegende Einzelzellen handelt, wird leicht zu entscheiden sein mit Hilfe des Elektronenmikroskopes. Damit können möglicherweise auch feinere Strukturunterschiede zwischen den Goormaghtighschen Zellen einerseits und den Becherschen und den epitheloiden Zellen andererseits herausgearbeitet werden.

Zur Nomenklatur möchten wir noch erwähnen, daß die epitheloiden Zellen der Arteriola afferens synonym oft auch als „*juxtaglomeruläre Zellen*" bezeichnet werden. Ferner wird im angelsächsischen Schrifttum häufig von einem „*juxtaglomerulären Apparat*" gesprochen, wozu dann außer den epitheloiden Zellen (Polkissen) auch die Goormaghtighschen Zellhaufen gerechnet werden. H. Becher (1949), dem wir uns in diesem Punkt vorläufig anschließen möchten, zählt zum *juxtaglomerulären Regulationsapparat* die vier am Anfang dieses Kapitels aufgezählten Baubestandteile (s. auch G. Schloss 1946, O. Pompeiano 1957).

Die bis heute vorliegenden funktionellen Deutungsversuche sind nichts anderes als mehr oder weniger wahrscheinliche interessante Hypothesen.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen über den juxtaglomerulären Apparat sind heute noch außerordentlich selten. Trotz gewissenhaften Suchens konnten wir bisher nur vier diesbezügliche Veröffentlichungen finden, nämlich von A. J. Dalton (1951), H. Braunsteiner, K. Fellinger und F. Pakesch (1956), A. Bohle (1959) sowie von Ch. Oberling und P.-Y. Hatt (1960); dazu kommt noch die Zusammenfassung eines Kongreßreferates von P. M. Hartroft (1956). Die Macula densa wird einzig von Oberling und Hatt kurz erwähnt. Über die Ultrastruktur der Becherschen Zellen ist offenbar noch gar nichts bekannt.

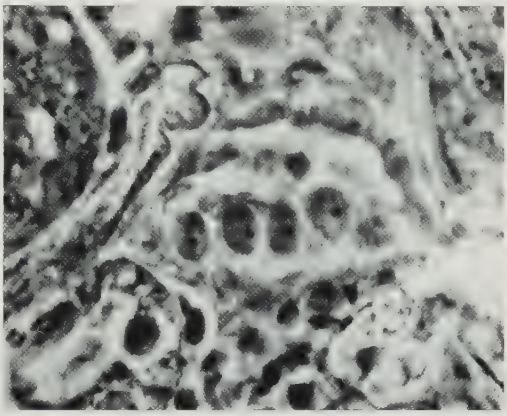

Abb. 2. „Dicker Schnitt" eines in Methacrylat eingebetteten Nierenrindenstückchens (Katze), photographiert im Phasenkontrastmikroskop. Man erkennt eine Macula densa und darunter einen Goormaghtighschen Zellhaufen. Links von der Macula, zwischen ihr und dem Anschnitt eines Hauptstückes, die Arteriola efferens

Es ist ein technisches Problem, für die Elektronenmikroskopie geeignete Schnitte herzustellen, in welchen die zur Diskussion stehenden Zellen überhaupt vorkommen. Es schien uns jedoch notwendig, diese außerordentlich mühsamen Untersuchungen in Angriff zu nehmen und gleichzeitig an Nieren verschiedener Säugetiere durchzuführen.

B. Untersuchungsmaterial und -methode

Nierenpräparate von 9 weißen Mäusen, 1 Wistar-Ratte, 2 Katzen und 1 Rind wurden verarbeitet. Die der Nierenrinde entnommenen Gewebestückchen von 1—2 mm^3 wurden zum Teil in 1%igem gepuffertem Osmiumtetroxyd nach Palade (1952, aber mit 0,045 g/cm^3 Saccharosezusatz nach Caulfield 1957) 1 Std bei 0°C fixiert und über Alkohol in Methyl-Butylmethacrylat 1:9 eingebettet (Abb. 3, 4), zum Teil — Material aus Nieren von 3 Mäusen — in gepuffertem Osmiumtetroxyd ohne Saccharosezusatz bei Zimmertemperatur fixiert und dann nach der Methode von A. Ryter und E. Kellenberger (1958) über Aceton in Polyester (Vestopal) eingeschlossen (Abb. 5—10).

Die elektronenmikroskopisch untersuchten Schnitte haben eine Dicke von 200—400 Å; sie sind mit einem „LKB 4800 Ultrotome" (Glasmesser) hergestellt und auf Formvar-Membranen montiert worden. Das RCA-Elektronenmikroskop, das wir im „Centre de microscopie électronique de l'Université de Lausanne"[1] für unsere Untersuchungen benützen können, ist das Modell EMU 3C. Die Aufnahmen wurden bei einer Strahlspannung von 50 kV und mit einer 50 μ-Objektiv-Kontrastblende angefertigt. Photoplatten: „Kodak Lantern Slide Plates, Medium".

[1] Herrn Alain Gautier, Chef des Zentrums für Elektronenmikroskopie, möchten wir auch an dieser Stelle für seine wertvollen technischen Ratschläge bestens danken.

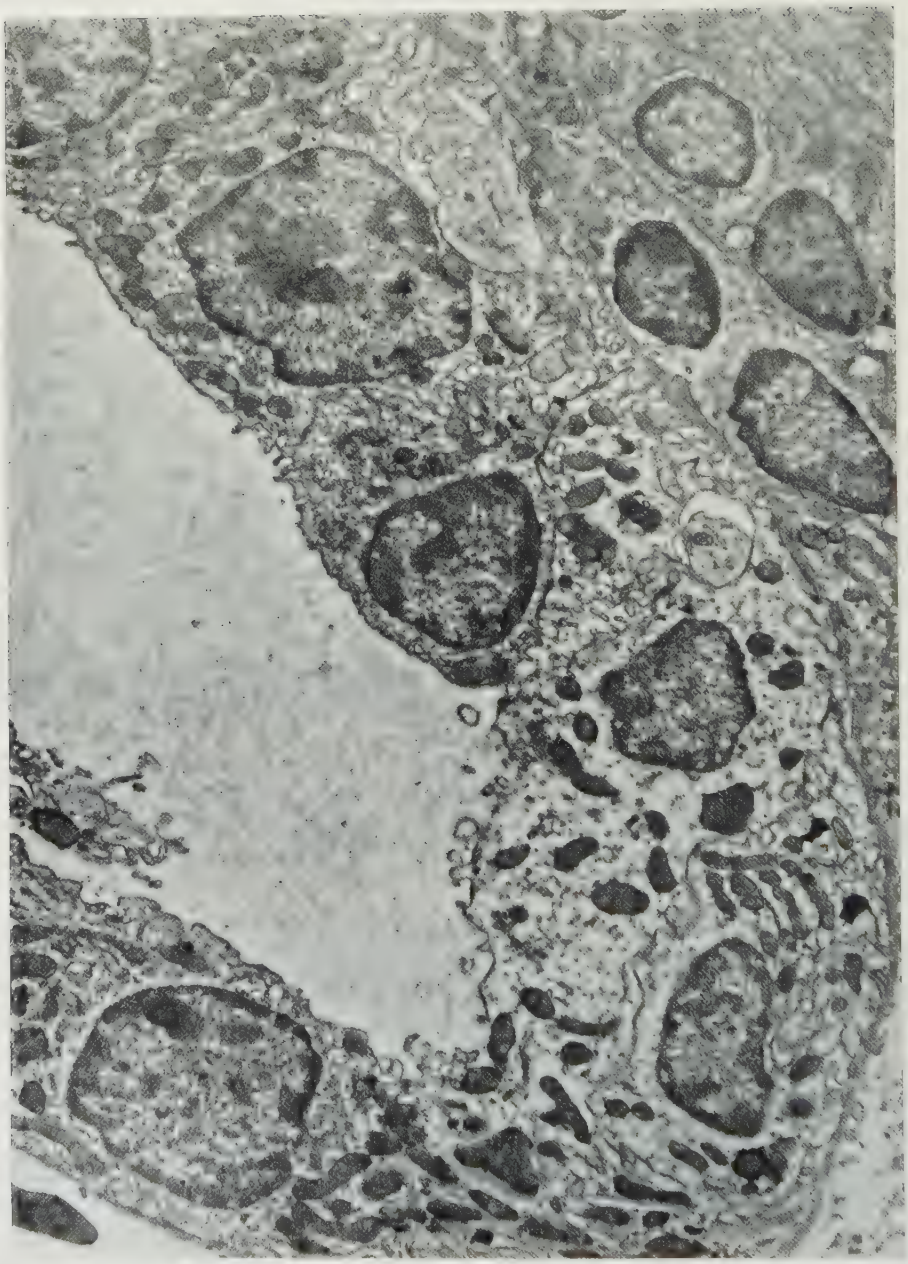

Abb. 3. Pars contorta eines Mittelstückes (Ratte): links unten eine gewöhnliche Mittelstückzelle, rechts von der Lichtung die höheren Macula-Zellen; rechts oben, von der Macula densa durch eine Basalmembran getrennt, vier Kerne von Goormaghtighschen Zellen. Endvergrößerung 10 950fach

Die Hauptschwierigkeit bei unseren Untersuchungen ist, die gewünschte Region im Elektronenmikroskop zu finden. Deshalb stellen wir zuerst verhältnismäßig dicke Schnitte (von etwa 1—2 μ) serienmäßig her und kontrollieren sie fortlaufend im Phasenkontrast-Mikroskop. Dazu werden die Methacrylat-Schnitte in Glycerin, die Vestopal-Schnitte in absolutem Äthylalkohol montiert. Sobald man im Niveau des juxtaglomerulären Apparates angekommen

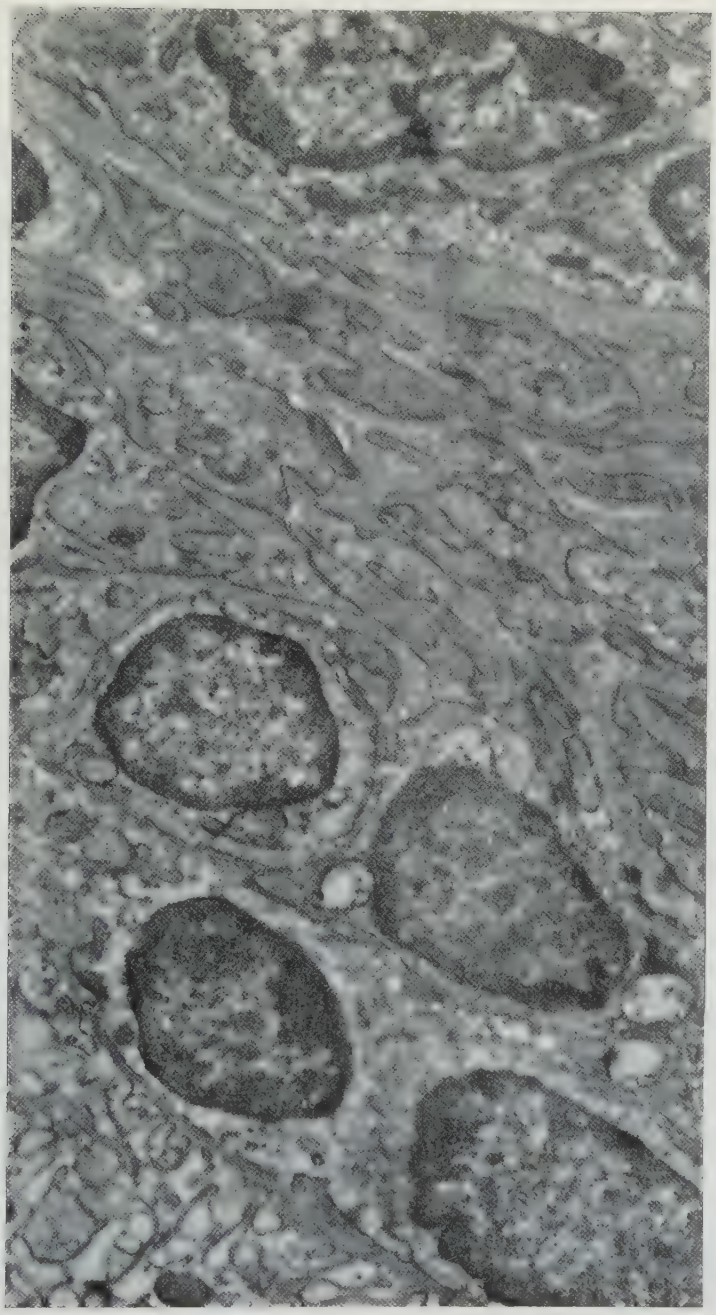

Abb. 4. Die Goormaghtighschen Zellen sind von einem komplizierten Netzwerk von Membranen umgeben. Links unten ein Anschnitt der Macula densa. Ratte. Endvergrößerung 19800fach

ist (Abb. 2), wird die Blockoberfläche auf die uns interessierende Region reduziert, und von nun an wird eine Serie von Dünnschnitten für die Elektronenmikroskopie angefertigt. Liegt die gesuchte Region zufällig relativ tief im eingebetteten Organfragment, so müssen wir unter Umständen eine nicht-optimale Fixierung in Kauf nehmen.

C. Befunde

Die Abb. 3 zeigt einen Anschnitt der Pars contorta eines Mittelstückes (Rattenniere) in Höhe der *Macula densa*, von welcher rechts von der Lichtung des Kanäl-

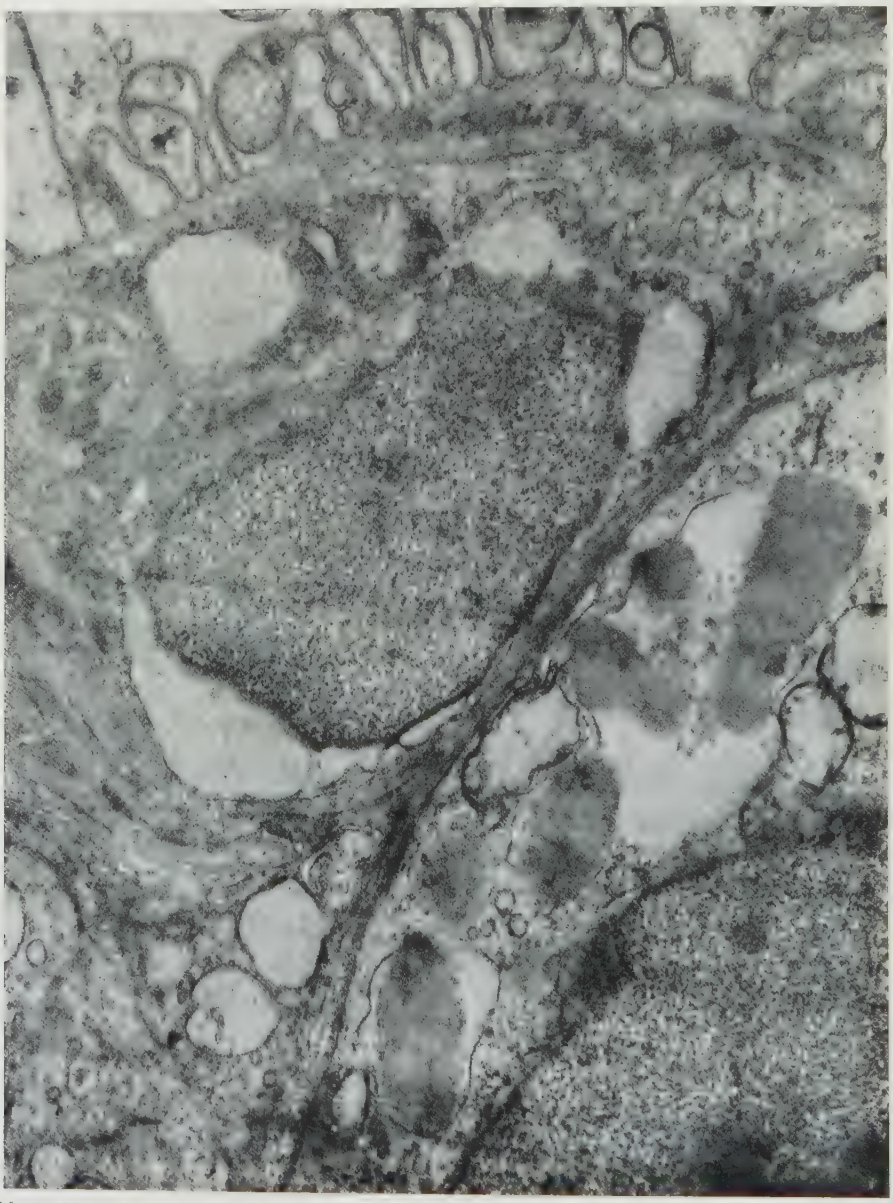

Abb. 5. Oben im Bild ein basaler Anschnitt der Macula densa; dann folgt eine Goormaghtighsche Zelle (mit breitem perinukleärem Raum), darauf ein Teil einer epitheloiden Zelle der Arteriola afferens. Beachte auch die enge topographische Beziehung zwischen den erwähnten drei Bestandteilen des juxtaglomerulären Regulationsapparates. Maus. Endvergrößerung 22 800fach

chens einige Zellen sichtbar sind. Diese sind höher als die gegenüberliegenden, nicht mehr zur Macula gehörenden Mittelstückzellen (eine davon links unten im Bild), wo andererseits das Chondriom reichlicher vorhanden ist. Auch die Lage

der Mitochondrien ist in den hier miteinander verglichenen Zellen nicht dieselbe: jene zeigen in den gewöhnlichen Mittelstückzellen vorzugsweise eine basale Lagerung, während sie in den Macula-Zellen infranukleär im allgemeinen weniger häufig sind und auch die glatten Doppelmembranen (Zytomembranen, s. auch Abb. 5) hier weniger tief und weniger geordnet in den Zelleib eindringen.

Im gleichen Bild sind rechts oben noch vier Kerne aus einem *Goormaghtighschen Zellhaufen* zu erkennen. Für die Abb. 4, welche mit stärkerer Vergrößerung

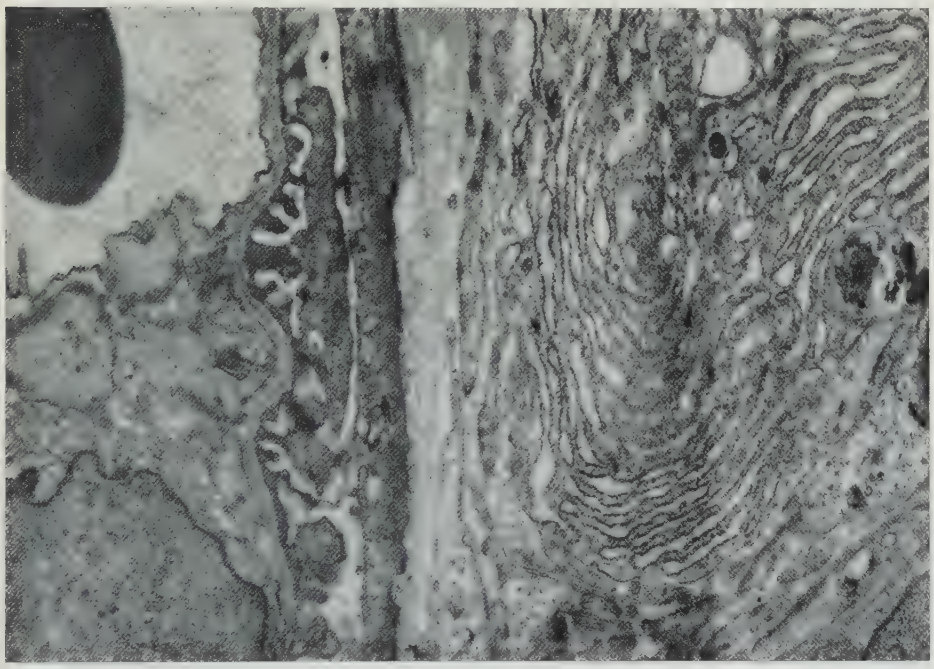

Abb. 6. Rechts eine „interstitielle Zelle" mit gut ausgebildetem Ergastoplasma, links Anschnitt eines Nierenkörperchens. Maus. Endvergrößerung 18600fach

aufgenommen wurde, ist das Präparat nach unten verschoben worden. Man sieht nun außer den Goormaghtighschen Kernen, die eine relativ dichte Struktur aufweisen und in der Regel länglich geformt sind, ein kompliziertes Netzwerk von breiten Membranen. Auf die Ultrastruktur dieser Zellen (Abb. 5), die in sehr enger topographischer Beziehung zur Macula densa stehen (Abb. 3—5), werden wir in einer späteren Arbeit zurückkommen. Die Frage, ob z.B. ein breiter perinukleärer Raum, eine vakuoläre Struktur des Zelleibes oder ein gut ausgebildetes Ergastoplasma für jene Zellen — zumindest in einem bestimmten Funktionszustand — charakteristisch ist, mag daher zunächst offenbleiben.

In unmittelbarer Nachbarschaft des Gefäßpoles des Nierenkörperchens, aber auch in weiterer Entfernung, haben wir nicht selten Zellen mit einem schönen Ergastoplasma festgestellt (Abb. 6; Mäuseniere). Um sie mit Bestimmtheit dem einen oder anderen Zelltyp zuordnen zu können, sind indessen weitere systematische Untersuchungen notwendig.

Ähnliches wäre von weiteren, wieder anders aussehenden, kleinen Zellen zu sagen, die ebenfalls in der untersuchten Gegend gelegen und nicht den Polkissen-

Zellen zuzurechnen sind. Die Struktur des Zelleibes ist durch das reichliche Vorkommen von Bläschen und elektronendichten Körnchen gekennzeichnet (Abb. 7; Mäuseniere).

Schließlich wären auch noch einige erste Befunde mitzuteilen über die *epitheloiden Zellen*, die in der Wand der Arteriola afferens, besonders in deren präglomerulärem Abschnitt, gefunden werden können. Diese relativ großen Zellen liegen, vom Endothel durch eine Membran getrennt, an Stelle der glatten Muskelzellen (Abb. 8; Mäuseniere). Lichtmikroskopisch sind diese auffällig hellen, anscheinend myofibrillenfreien Zellen oft untersucht worden; manche Autoren haben auf das Vorkommen von Granula hingewiesen. Elektronenmikroskopisch können sie, offenbar in Abhängigkeit vom jeweiligen Funktionszustand, recht verschieden aussehen, sogar in ein und derselben Niere (s. ferner Abb. 9 und 10; Mäuseniere).

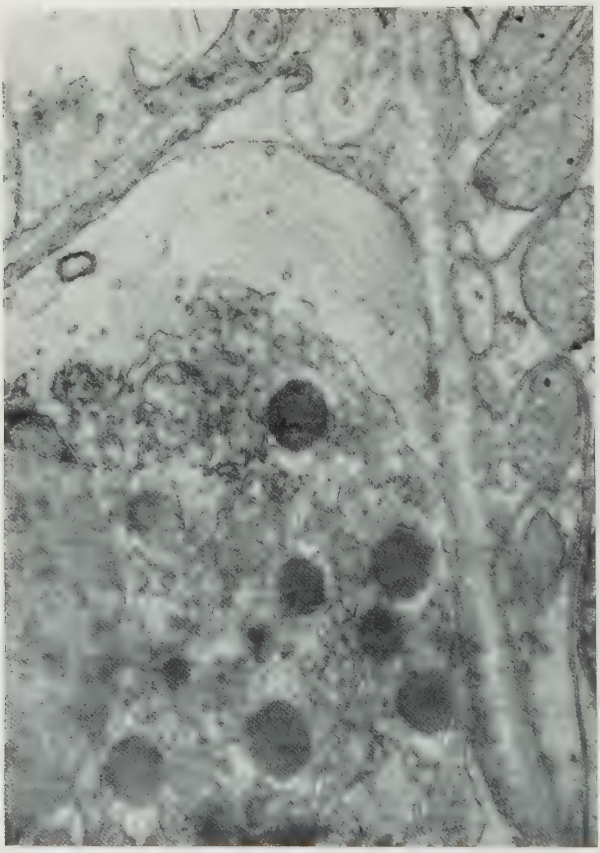

Abb. 7. Teil einer weiteren „interstitiellen Zelle". Maus. Endvergrößerung 28 500fach

In Abb. 9 finden wir, rechts vom Zellkern, neben großen Mengen von dunkleren, kleineren Bläschen (in der Größenordnung der Mitochondrien) große, helle Vesiculae, deren Inhalt leicht fleckig erscheint. Zwischen den verschieden großen Bläschen liegen ergastoplasmatische und körnige Strukturen. Übergangsformen vom Ergastoplasma zu den kleinen und weiter zu den großen Bläschen können festgestellt werden. In der Abb. 10 sieht man nun eine andere epitheloide Zelle der gleichen Arteriola afferens. In dieser erkennt man, wie auch in Abb. 5, außer den Ribosomen (Palade-Granula) wieder die schon oben erwähnten Bläschen, die von einer einfachen Membran umgeben sind; nun erscheint aber der Inhalt der großen Vesiculae dunkler. Rechts unten im Bild ist ein Bündel von Myofibrillen zu sehen.

D. Besprechung der Ergebnisse

Wie schon eingangs erwähnt, liegt eine erste Schwierigkeit in der Herstellung elektronenmikroskopisch untersuchbarer Dünnschnitte, in welchen die juxta-

glomerulären Spezialeinrichtungen — zumindest teilweise — auch aufgefunden werden können. Dieses rein technische Problem kann durch das oben beschriebene Vorgehen als gelöst betrachtet werden. Eine systematische Erforschung des in

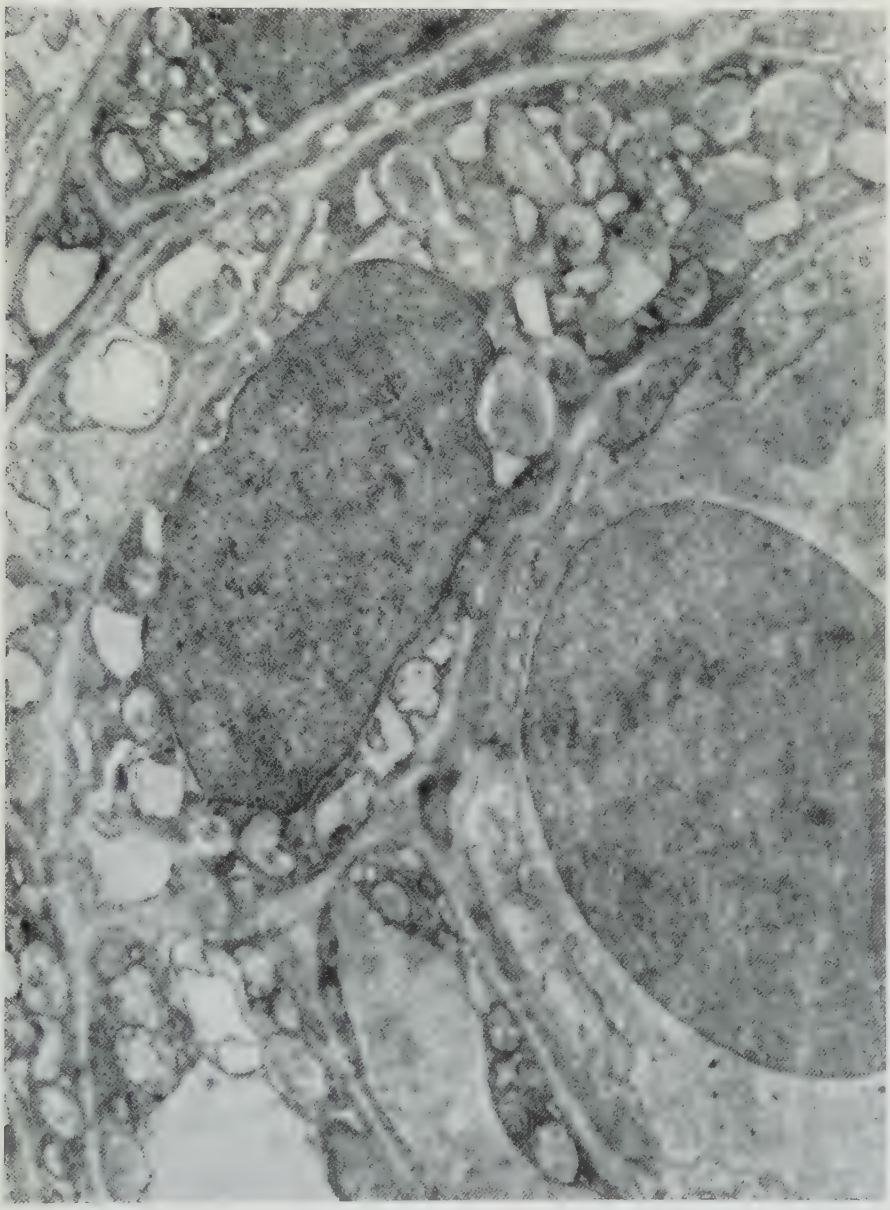

Abb. 8. Epitheloide Zellen in der Wand einer Arteriola afferens (Polkissen). Rechts, in der vom Endothel begrenzten Gefäßlichtung, ein rotes Blutkörperchen. Maus. Endvergrößerung 16 000fach

der Gegend des glomerulären Gefäßpoles liegenden Regulationsapparates kann nur mit Hilfe von Serienschnitten durchgeführt werden; ihre Herstellung und nachherige Auswertung ist natürlich sehr zeitraubend.

Eine weitere Schwierigkeit bietet die topographische und ultrastrukturelle Diagnose der verschiedenen Bestandteile der zur Diskussion stehenden juxta-

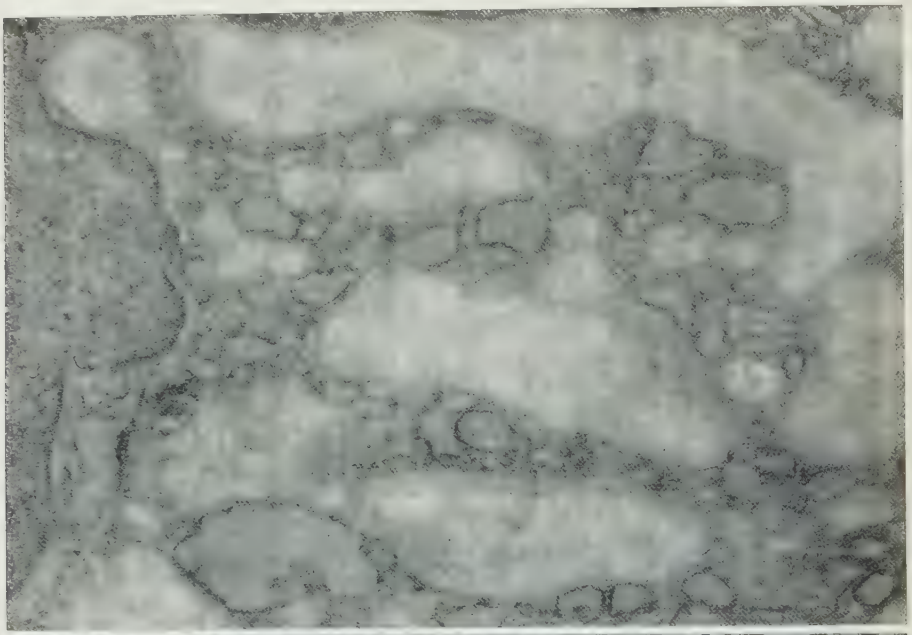

Abb. 9

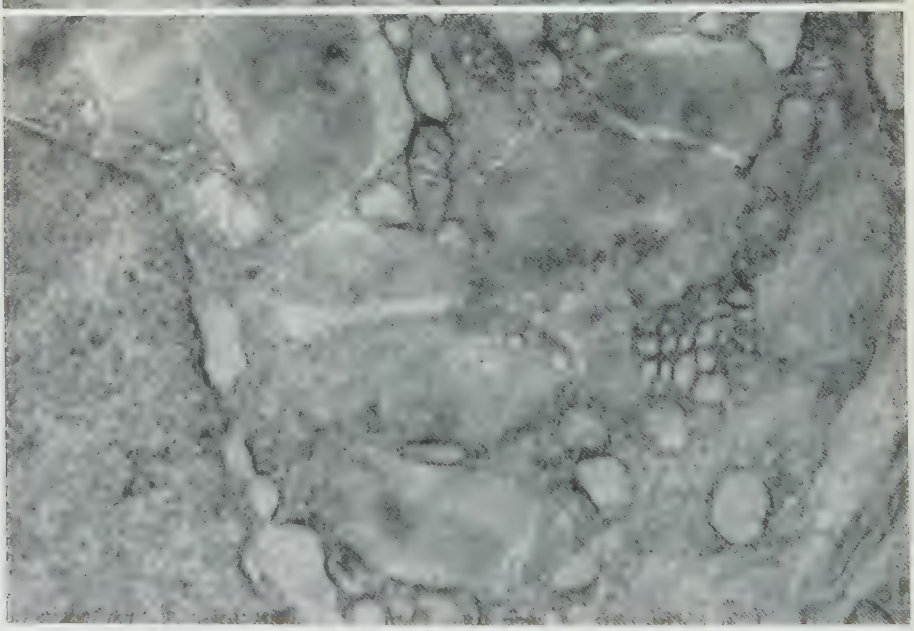

Abb. 10

Abb. 9 u. 10. Bei stärkerer Vergrößerung aufgenommene epitheloide Zellen einer Arteriola afferens (Maus). Endvergrößerung von Abb. 9 (oben) 25000fach, von Abb. 10 (unten) 28500fach. Links in beiden Abbildungen ist der Zellkern angeschnitten. In Abb. 10 rechts unten ein Myofibrillenbündel

glomerulären Einrichtungen; diese wird noch erschwert durch die Möglichkeit des Vorliegens verschiedener Funktionszustände. Dieses zweite Problem wird

mit zunehmender Erfahrung allmählich überwunden werden können. Als Fernziel betrachten wir das Studium experimentell erzeugter Aktivitätsunterschiede der verschiedenen Zellen des Regulationsapparates und die elektronenmikroskopische Untersuchung von Präparaten, an welchen histochemische Reaktionen durchgeführt worden sind.

Eine dritte Schwierigkeit besteht für uns in der Beschaffung von lebensfrisch fixiertem gesundem menschlichem Material; dieses wäre nur durch intravitale Punktion zu bekommen, was uns zur Zeit nicht möglich ist. Aus diesem Grunde arbeiten wir mit Nieren verschiedener Tiere, wobei wir gleichzeitig auch der vergleichenden Ultrastruktur der juxtaglomerulären Einrichtungen unsere Beachtung schenken wollen.

Über die Histologie und Histochemie der *Macula densa* ist von O. Bucher und E. Zimmermann (1960) berichtet worden. Gewisse mit dem Lichtmikroskop an gefärbten Präparaten gemachte Beobachtungen können elektronenmikroskopisch bestätigt und nun auch besser erklärt werden (Abb. 3 und 5). So sind die Macula-Zellen und insbesondere ihr basaler Abschnitt wesentlich ärmer an (zudem schmäleren) Mitochondrien als die ihnen gegenüberliegenden, nicht mehr zur Macula gehörenden Mittelstückzellen, wo schon lichtmikroskopisch eine basale Streifung nachzuweisen ist. Dieser Befund war nach den Untersuchungsergebnissen von N. Goormaghtigh (1937) und H. Okkels (1950) durchaus zu erwarten. Auch die von der basalen Zellmembran ausgehenden glatten Doppellamellen (Zytomembranen) sind nach unseren Beobachtungen in den Macula-Zellen viel weniger gut ausgebildet, im Gegensatz zu den Angaben von Ch. Oberling und P. Y. Hatt (1960).

Es besteht elektronenmikroskopisch somit ein deutlicher Unterschied zwischen den Macula-Zellen, wo in unseren Präparaten beispielsweise die Mikrovilli besser ausgebildet sind, und den übrigen Mittelstückzellen. Auf Einzelheiten wollen wir jedoch, auf Grund eines größeren Untersuchungsgutes, erst in einer folgenden Veröffentlichung eingehen. Erwähnt sei lediglich noch die auch von uns festgestellte enge Beziehung zwischen der Macula und den anderen Bestandteilen des juxtaglomerulären Apparates, wie den epitheloiden Zellen oder den Goormaghtighschen Zellen. Eine Basalmembran ist jedoch immer ausgebildet (Abb. 5), wie — im Gegensatz zu Goormaghtigh (1937), de Muylder (1945) und McManus (1947) — auch Bucher und Zimmermann feststellen konnten. Kapillaren haben wir an dieser Stelle bisher nie gesehen, worauf auch Ch. Oberling und P.-Y. Hatt hingewiesen haben.

Die *Goormaghtighschen Zellhaufen* erkennt man als Anhäufung von in der Mehrzahl länglichen Zellkernen, die wesentlich kleiner, dafür jedoch dichter strukturiert sind als die der Macula; zudem zeigt die Kernoberfläche häufig kleine Einkerbungen. Das Vorliegen eines Plasmodiums, das H. Becher (1949) für wahrscheinlich hielt — er gab dem von Goormaghtigh (1932) als „corpuscule nerveux sensitif" bezeichneten Gebilde den neuen Namen „Sockelplasmodium"—, kann mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Kerne mit dem sie umgebenden Zytoplasma, in welchem auch kleine Mitochondrien gesehen werden, liegen in den Maschen eines komplizierten Systems von Basalmembranen (Abb. 4 und 5). Diese Struktur ist sehr auffällig und erlaubt uns, neben anderen Struktureigentümlichkeiten, die Goormaghtighschen Zellen von den epitheloiden Zellen der Polkissen zu unterscheiden, was lichtmikroskopisch bei gewissen Funktionszuständen schwierig sein kann (s. Becher, l. c.).

Ob die Ultrastruktur der Goormaghtighschen Zellen die Hypothese ihres Entdeckers unterstützt, nach welcher es sich um sensible Endkörperchen (etwa im Sinne der Meissnerschen Körperchen) handeln soll, möchten wir vorläufig nicht endgültig entscheiden. Es sei immerhin zugegeben, daß den uns bisher zur Verfügung stehenden Bildern von Goormaghtighschen Zellenhaufen eine gewisse oberflächliche Ähnlichkeit mit Meissnerschen Körperchen nicht abzusprechen ist (vgl. z.B. N. Cauna 1960, S. 374, Abb. 15), während andererseits in Einzelheiten anscheinend doch wesentliche Unterschiede bestehen. Ferner haben wir uns gefragt, ob es sich bei dem von H. Knoche (1951) zwischen den Kernen des Goormaghtighschen Zellhaufens durch Versilberung dargestellten „zarten Neurofibrillennetz" nicht um das oben beschriebene Membransystem handeln könnte.

Ob Goormaghtighsche Zellen über verschiedene Zwischenstufen in epitheloide Polkissen-Zellen übergehen können, wie D. B. Kroon (1960) jüngst zu zeigen versucht hat, wird ebenfalls noch genauer untersucht werden müssen; nach Ph. M. Hartroft (1956) besteht zwischen den beiden Zellarten elektronenmikroskopisch jedoch ein deutlicher Unterschied.

Wir glaubten schon, das für das Goormaghtighsche Gebilde elektronenmikroskopisch charakteristische Membranfachwerk als erste gesehen zu haben, als wir auf eine eben erschienene kurze Veröffentlichung von Ch. Oberling und P.-Y. Hatt (1960) stießen, in welcher diese Struktur auch erwähnt und als „lacis" bezeichnet ist.

Ch. Oberling und P.-Y. Hatt, welche nach Palade fixierte Rattennieren untersucht haben, geben davon folgende Beschreibung: »L'élément le plus frappant de cette formation est le stroma formé par un lacis de membranes basales grossièrement taillées, formant un réseau à mailles plus ou moins serrées d'une extraordinaire complexité structurale«.

Auf ihre funktionelle Deutung im Rahmen des juxtaglomerulären Regulationsapparates werden wir in einer späteren Arbeit zurückkommen.

Auch H. Braunsteiner, K. Fellinger und F. Pakesch (1956) haben drei Zellgruppen von „juxtaglomerulären Zellen" (in Nieren von Wistar-Ratten) untersuchen können. Aus ihren Beobachtungen „geht nicht eindeutig hervor, ob die juxtaglomerulären Zellen mit den Polkissen identisch sind", doch neigen sie eher zu der Ansicht, daß es sich um zwei prinzipiell verschiedene Zellarten handelt. Daraus müßte man schließen, daß es sich bei den von ihnen beschriebenen „juxtaglomerulären Zellen", welche durch ein sehr gut ausgebildetes Ergastoplasma ausgezeichnet sind, um Goormaghtighsche Zellen handeln würde. Auf Grund von Strukturanalogien glauben die erwähnten Verfasser annehmen zu dürfen, „daß die juxtaglomerulären Zellen eine eiweißsezernierende Funktion ausüben und somit als endokrines Organ gewertet werden können". So weit möchten wir selbst allerdings noch lange nicht gehen, ja wir sind sogar sehr im Zweifel darüber, ob die von Braunsteiner, Fellinger und Pakesch abgebildeten Zellen überhaupt Goormaghtighsche Zellen sein könnten (wir würden eher an Plasmazellen denken).

Indessen haben wir gelegentlich auch — und zwar nicht nur in Nähe des Gefäßpoles — reichlich Ergastoplasma enthaltende Zellen gefunden (vgl. Abb. 6). Vorläufig wollen wir nur diese Tatsache zur Kenntnis geben; wir hoffen aber, bald mit Bestimmtheit sagen zu können, wo diese Zellen einzuordnen sind. Das gleiche Problem stellt sich für die oft auch weiter vom Nierenkörperchen entfernt liegenden viel kleineren Zellen, von welchen in Abb. 7 ein Ausschnitt bei sehr starker Vergrößerung zu sehen ist. Auffällig ist hier die vesikuläre Struktur und das Vorhandensein von osmiophilen Granula.

Im intertubulären Stroma muß auch mit dem Vorkommen von Bindegewebezellen gerechnet werden.

Es bleiben nun noch die *epitheloiden Zellen* (juxtaglomerulären Zellen) zu besprechen, die in der Wand der Arteriola afferens — am leichtesten in deren präglomerulärem Abschnitt — gefunden werden (Abb. 1 und 8); sie sind oft asymmetrisch angeordnet und auf der einen Seite zur Bildung eines „Polkissens" angehäuft. Nach lichtmikroskopischen Untersuchungen handelt es sich um verhältnismäßig große, rundliche oder polygonale, im allgemeinen helle Zellen mit einem chromatinarmen, gelegentlich exzentrisch gelegenem Kern. Im Zelleib sind manchmal kleine Vakuolen zu erkennen, die sich nicht färben lassen; manchmal sind feine Körnchen durch Färbung oder Versilberung darstellbar (s. bei M. Clara 1956, H. Becher 1949, D. B. Kroon 1960). Myofibrillen sollen in der Regel im Zytoplasma der epitheloiden Zellen fehlen, doch können auch Zwischenformen von epitheloiden Zellen und glatten Muskelzellen vorkommen, wobei es sich jedoch nicht unbedingt um „Übergangsformen" zu handeln brauchte (vgl. hierzu M. Clara 1956).

Elektronenmikroskopisch sind diese Zellen — wohl zufällig — von A. J. Dalton (1951) in der Mäuseniere erstmals gesehen, doch nicht näher untersucht worden. Im Zytoplasma fand er große osmiophile Körner. Auch P. M. Hartroft (1956) erwähnt kugelige bis ovoide osmiophile Granula in den juxtaglomerulären Zellen der Rattenniere. Die Mitochondrien sind gut zu erkennen; ferner findet sich reichlich Ergastoplasma mit deutlichen Granula. Ch. Oberling und P.-Y. Hatt sprechen von voluminösen, mehr oder weniger osmiophilen Sekretionsgranula. A. Bohle (1959) beschreibt in der Mäuseniere, wo diese Zellen seinerzeit von J. H. C. Ruyter (1925) entdeckt worden sind, die Granula „als homogene, meist rundliche Gebilde, die zwischen den Zysternen des endoplasmatischen Retikulums liegen. Diese opaken Granula der epitheloiden Zellen sind sehr viel größer als die Mitochondrien. Sie konfluieren teilweise miteinander".

Diesen Angaben entsprechen im großen ganzen auch unsere Befunde. Bei genauerer Untersuchung mit stärkerer Vergrößerung — worüber im Schrifttum bisher noch nichts berichtet worden ist — sehen wir neben Ribosomen und typischen ergastoplasmatischen Strukturen alle möglichen Übergangsformen vom Ergastoplasma zu den mannigfaltigen Formen von Bläschen, deren Inhalt verschieden kontrastreich sein kann (Abb. 5, 8, 9 und 10). Offenbar bestehen hier je nach Funktionszustand wesentliche Unterschiede auch in der Ultrastruktur, wie noch durch weitere Untersuchungen zu zeigen sein wird.

Die Oberfläche der Zellkerne der epitheloiden Zellen zeigt nicht selten buckelartige Vorwölbungen (Abb. 8 und 9), und auch im Elektronenmikroskop fällt oft eine exzentrische Lagerung des Kernes auf. In der Abb. 10 sind zudem Myofibrillen deutlich zu erkennen. Wie A. Bohle angibt, sind — so auch in unseren Präparaten — die einzelnen epitheloiden Zellen „von zarten basalmembranartigen Strukturen umgeben" und von den Endothelzellen durch eine Basalmembran getrennt.

Die vorliegende Veröffentlichung bringt wohl einige konkrete Befunde, noch mehr jedoch zeigt sie, wie schon der Untertitel vermuten ließ, Probleme auf, denen weiter nachgegangen werden muß. Es wird noch ein weiter Weg zurückzulegen sein, bis alle morphologischen und funktionellen Einzelheiten des juxtaglomerulären Regulationsapparates der Niere bekannt sein werden. Seine Erforschung ist jedoch eine unbedingte Notwendigkeit, sind doch die heute diskutierten

Hypothesen über die Rolle, welche seine verschiedenen Bestandteile beim gesunden und kranken Individuum, wie z. B. beim renalen Hypertoniker, spielen, auf noch recht unsicheren Unterlagen aufgebaut.

Summary

After a general view of the constituents of the juxtaglomerular apparatus of the kidney, the authors are presently publishing on this subject some of their preliminary findings which have been obtained with the aid of the electron microscope:

The cells of the *macula densa* are distinguished from the other cells of the distal convoluted tubule by a lesser development of the infolded basal plasma membranes as well as that of the chondriome which is generally found in a circum- and supranuclear position.

The *cells of* Goormaghtigh are in a close topographical relationship with the macula densa, although separated from it by a basement membrane; they are integrated in a complex system of basement membranes.

The *epithelioid cells of the afferent arteriole* contain, in addition to ribosomes and ergastoplasmic structures, vesicles of which the size and the contrast of the content are different.

The *paraportal cells of* Becher have not as yet been positively identified with the electron microscope.

The intertubular space is poor in cells; the various "*interstitial cells*", often rich in ergastoplasm, are yet to be studied in detail.

Literatur

Becher, H.: Über besondere Zellengruppen und das Polkissen am Vas afferens in der Niere des Menschen. Z. wiss. Mikrosk. **53**, 205—214 (1936).

— Die gestaltlichen Grundlagen der Strombahnsteuerung am Gefäßpol der Malpighischen Körperchen in der menschlichen Niere. Ärztl. Forsch. **3**, 351—367 (1949).

Bohle, A.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Struktur des Gefäßpols der Niere. Verh. dtsch. Ges. Path. **43**, 219—225 (1959).

Braunsteiner, H., K. Fellinger u. F. Pakesch: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an juxtaglomerulären Zellen. Klin. Wschr. **34**, 375—378 (1956).

Bucher, O., et E. Zimmermann: A propos de la macula densa du rein. Acta anat. (Basel) **42**, 352—371 (1960).

Caulfield, J. B.: Effects of varying the vehicle for OsO_4 in tissue fixation. J. biophys. biochem. Cytol. **3**, 827—830 (1957).

Cauna, N.: The distribution of cholinesterase in the cutaneous receptor organs, especially touch corpuscles of the human finger. J. Histochem. Cytochem. **8**, 367—375 (1960).

Clara, M.: Anatomie und Biologie des Blutkreislaufes in der Niere. Arch. Kreisl.-Forsch. **3**, 42—94 (1938).

— Die arterio-venösen Anastomosen, 2. Aufl. Wien: Springer 1956.

Dalton, A. J.: Structural details of some of the epithelial cell types in the kidney of the mouse as revealed by the electron microscope. J. Nat. Cancer Inst. **11**, 1163—1185 (1951).

Feyrter, F.: Über die Endokrinie der menschlichen Niere. Virchows Arch. path. Anat. **306**, 135—174 (1940).

Goormaghtigh, N.: Les segments neuro-myo-artériels juxta-glomérulaires du rein. Arch. Biol. (Paris) **43**, 575—590 (1932).

— L'appareil neuro-myo-artériel juxta-glomérulaire du rein; ses réactions en pathologie et ses rapports avec le tube urinifère. C.R. Soc. Biol. (Paris) **124**, 293—296 (1937).

Hartroft, P. M.: A preliminary study of the electronmicroscopy of the renal juxtaglomerular cells. Correlation with light microscopy. Anat. Rec. **124**, 458 (1956).

Knoche, H.: Über die feinere Innervation der Niere des Menschen. II. Z. Zellforsch. **36**, 448—475 (1951).

Kroon, D. B.: Origin of the PAS-positive granulated ε-cells of the juxta-glomerular apparatus. Acta anat. (Basel) **41**, 138—156 (1960).

McManus, J. F. A.: Further observations on the glomerular root of the vertebrate kidney. Quart. J. micr. Sci. **88**, 39—44 (1947).

Muylder, Ch. de: Nouvelles observations sur les nerfs du rein humain et sur son appareil juxtaglomérulaire. C.R. Soc. Biol. (Paris) **139**, 189—191 (1945a).

— Recherches sur le développement de l'innervation du rein. Arch. Biol. (Paris) **56**, 1—70 (1945b).

Oberling, Ch., et P.-Y. Hatt: Ultrastructure de l'appareil juxta-glomérulaire du rat. C.R. Acad. Sci. (Paris) **250**, 929—930 (1960).

Okkels, H.: La zone angiotrope du segment III du tube urinaire des mammifères. Observations cytologiques de la région dénommée «macula densa» de l'appareil urinaire. Bull. Histol. Physiol. Path. **27**, 145—148 (1950).

Palade, G. E.: A study of fixation for electron microscopy. J. exp. Med. **95**, 285—297 (1952).

Pompeiano, O.: L'importanza delle cellule epiteliali dei corpuscoli malpighiani nell'attività endocrina del rene umano. Riv. Biol., nuova ser. 9 **49**, 1—55 (1957).

Ruyter, J. H. C.: Über einen merkwürdigen Abschnitt der Vasa afferentia in der Mäuseniere. Z. Zellforsch. **2**, 242—248 (1925).

Ryter, A., et E. Kellenberger: L'inclusion au polyester pour l'ultramicrotomie. J. Ultrastruct. Res. **2**, 200—214 (1958).

Schloss, G.: Der Regulationsapparat am Gefäßpol des Nierenkörperchens in der normalen menschlichen Niere. Acta anat. (Basel) **1**, 365—410 (1946).

Smith, H. W.: The kidney. Structure and function in health and disease. New York: Oxford University Press 1951.

Zimmermann, K. W.: Über den Bau des Glomerulus der Säugerniere. Z. mikr.-anat. Forsch. **32**, 176—278 (1933).

Professor Dr. Otto Bucher und Privatdozent Dr. Enrico Reale
Institut d'Histologie et d'Embryologie, Rue du Bugnon 9, Lausanne (Schweiz)

Zeitschrift für Zellforschung 54, 182—198 (1961)

Laboratoire d'Histologie, Faculté de Médecine, Marseille

ETUDE ULTRASTRUCTURALE D'IMAGES DE FONTE HOLOCRINE DANS LA CORTICO-SURRENALE

Par

Gérard Cotte et Nicole Cotte

Avec 14 Figures dans le Texte

(Manuscrit reçu le 30 Janvier 1961)

I. Introduction

Observant au microscope électronique la cortico-surrénale d'animaux normaux, Lever (1955) avait rencontré deux types différents de cellules glandulaires. Les cellules normales, relativement opaques aux électrons, étaient mêlées à quelques éléments plus clairs, apparemment dégénératifs, disséminés au sein du parenchyme. Lever formulait l'hypothèse de transformations cycliques d'un type cellulaire en l'autre, en liaison avec l'activité hormonogène de la glande.

Chez les animaux adultes et normaux que nous avons étudiés (8 Cobayes, une Ratte, 3 Lapines), une disposition semblable se rencontre, dans les zones fasciculée interne et réticulée. Dispersées parmi les éléments glandulaires normaux, certaines cellules montrent des modifications qui aboutissent à une dégénérescence complète, suivie de l'expulsion du contenu cellulaire dans la lumière des capillaires sanguins. Ce sont les aspects cytologiques de cette dégénérescence, ainsi que la destinée de ces cellules, qui font l'objet du présent travail.

II. Techniques utilisées

Les animaux sont rapidement anesthésiés à l'éther; après laparotomie, les surrénales sont recouvertes de fixateur, prélevées, puis coupées en deux avec une lame de rasoir. Le découpage du parenchyme en petits blocs est effectué dans une goutte de fixateur. Fixation 1 heure à 1 heure 30 dans OsO_4 à 2% tamponné selon Palade. L'inclusion au méthacrylate (méthyle 1 partie, butyle 9 parties) est faite après que les capsules de gélatine contenant le milieu d'inclusion et la pièce aient été soumises à l'action du vide. Dans ce but, les capsules sont placées sous une cloche à vide reliée à une pompe à palette par un tube de 25 cm de long rempli de charbon actif destiné à capter les vapeurs de méthacrylate. La polymérisation se fait en 12 heures sous l'action des rayons ultra-violets émis par un brûleur nu Philips HPK. Les coupes sont déposées sur des treillis dépourvus de membrane de support, puis recouvertes d'une pellicule de carbone dans un métalliseur, avec interposition d'un écran entre les électrodes de graphite et les préparations (Cotte 1960), enfin observées au microscope RCA EMU 3 C.

III. Résultats des observations

1. Les différents aspects cellulaires

Dans les zones fasciculée interne et réticulée du Cobaye et du Lapin (Fig. 1, 2, 3), les cellules normales ont un cytoplasme relativement dense, contenant de nombreuses mitochondries et des liposomes dont le nombre est plus grand dans les parties les plus internes de la glande. Ces liposomes sont généralement formés d'une coque très osmiophile, de contour grossièrement ovalaire, entourant une vacuole claire centrale; on rencontre aussi quelques liposomes pleins, dépourvus

de cette zone centrale claire. Par contre, chez la Ratte, ces liposomes sont généralement pleins, bordés éventuellement par quelques petites vacuoles claires (Fig. 11). Chez les trois espèces étudiées, le réticulum endoplasmique est bien développé; le noyau est régulier, sans condensation de sa chromatine.

Il semble qu'on puisse établir une sorte de classification évolutive de ces cellules, basée sur des aspects morphologiques, partant de la cellule normale pour aboutir

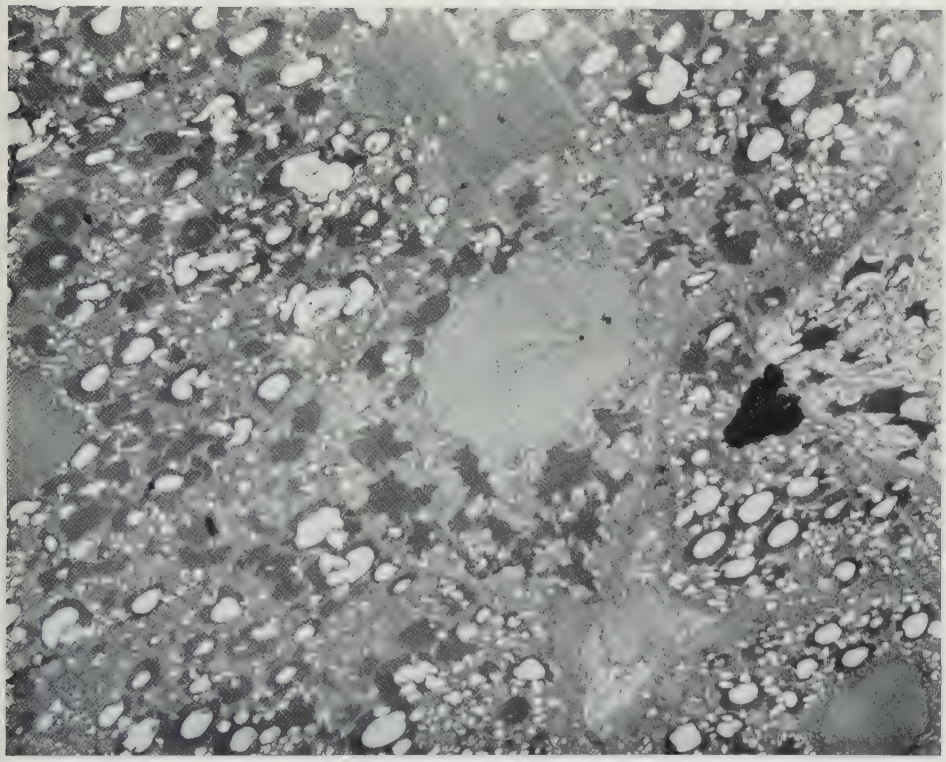

Fig. 1. Zone réticulée, Lapine. Les cellules normales ont un cytoplasme dense, rempli de liposomes creusés d'une vacuole centrale osmiophobe. La cellule du centre présente déjà quelques modifications. Son cytoplasme, un peu plus clair que celui des cellules intactes, montre de nombreuses mitochondries inaltérées, mais ses liposomes n'ont plus de vacuole centrale: leur contour est dentelé. Le noyau est normal. A l'extrême droite, une cellule franchement dégénérée. Grossissement: 4800 ·

à un élément franchement dégénéré. Les phénomènes initiaux sont moins nets chez la Ratte et le Cobaye: c'est chez la Lapine que les modifications sont le plus manifestes dès le début, et nous prendrons cet animal comme type de description.

Tout d'abord, les liposomes deviennent irréguliers et perdent leur vacuole centrale (Fig. 1). Ils sont alors homogènes, leur périphérie présente des incisures et des prolongements en racines, ce qui leur donne un aspect découpé, dentelé. Le cytoplasme est un peu moins dense, la cellule commence à trancher sur ses voisines. Les mitochondries sont toujours présentes, et ne montrent pas de modifications morphologiques nettes: à peine sont-elles légèrement augmentées de volume. Le noyau n'est pas altéré.

Dans un deuxième stade (Fig. 2), si le noyau n'est toujours pas modifié, le cytoplasme devient nettement plus clair, granuleux par places. Les mitochondries

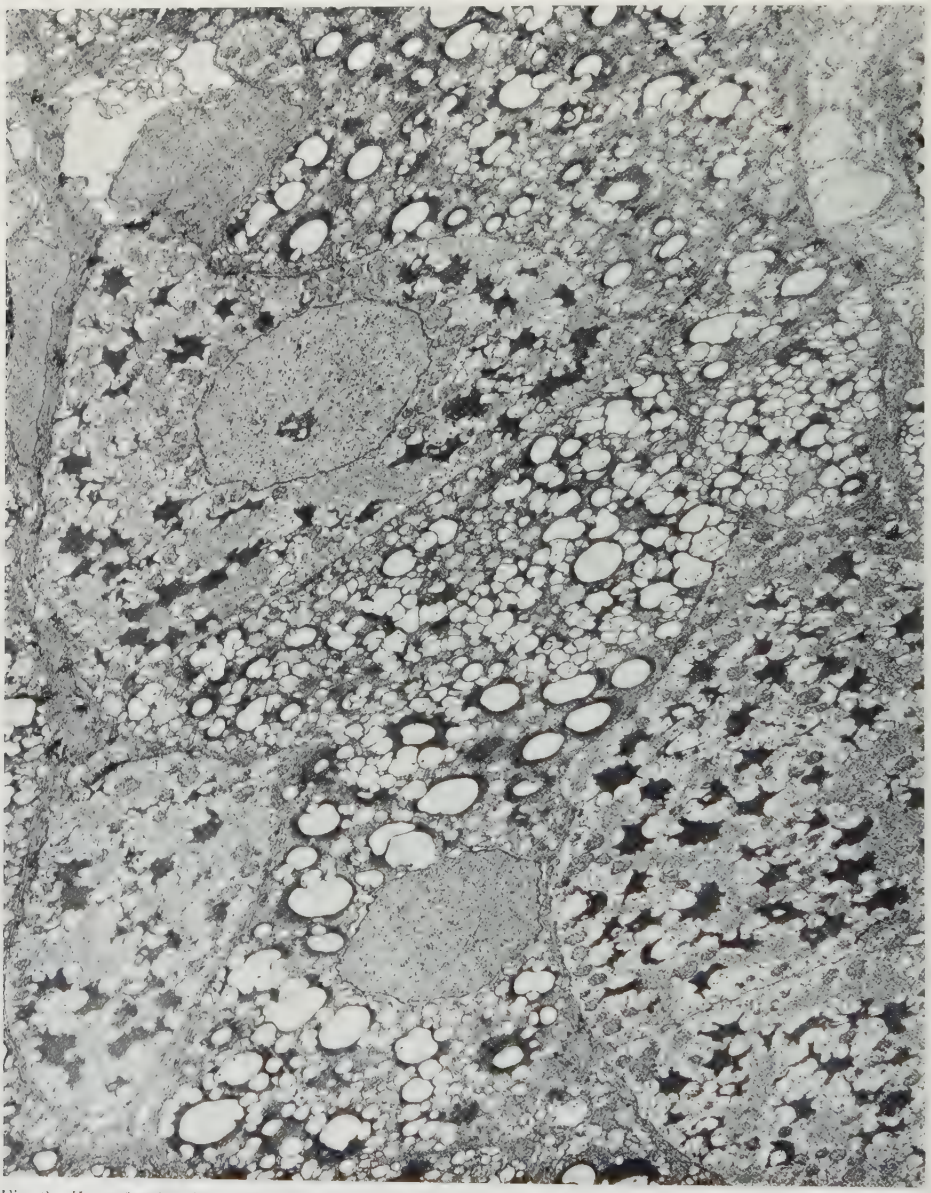

Fig. 2. Zone fasciculée interne, Lapine. Les quatre cellules à liposomes dentelés montrent le stade suivant dans la désorganisation cytoplasmique. Dans ces éléments, si le noyau est toujours normal, les mitochondries, raréfiées, sont gonflées et le cytoplasme contient des plages grisâtres composées d'amas microvésiculaires. Ces cellules dégénératives tranchent par leur aspect sur les cellules normales voisines. Grossissement: 4800 ×

sont gonflées, le diamètre des cavités du réticulum endoplasmique augmente. Mais c'est au niveau des liposomes que les modifications sont les plus évidentes: des

vacuoles claires, ébauchées déjà au stade précédent, entourent le liposome, s'insinuant dans les incisures qui le découpent. Les dimensions de ces vacuoles sont variables, mais il arrive déjà que le liposome paraisse complètement entouré d'une plage optiquement vide. Ces formations épineuses, toujours très osmiophiles, ressortent alors avec un contraste particulièrement net dans cette cellule, devenue très différente de ses voisines.

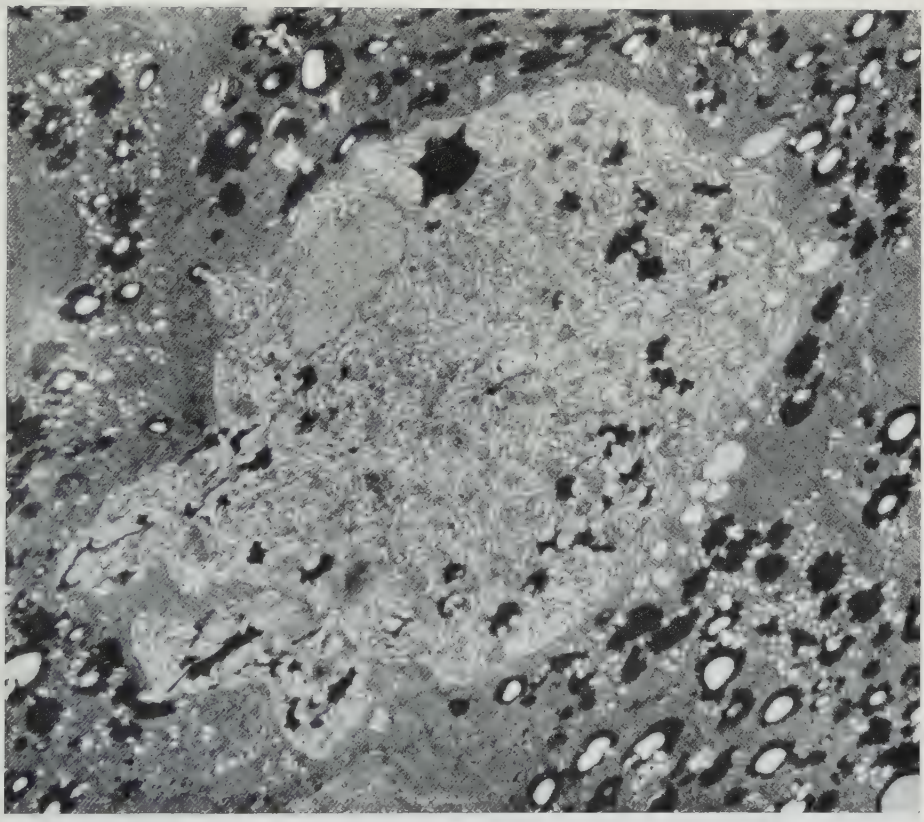

Fig. 3. Zone réticulée, Lapine. Parmi les cellules normales, l'élément dégénéré se remarque par sa densité, beaucoup plus faible, et par la désorganisation de son cytoplasme: le système vésiculo-vacuolaire y prend un développement considérable, sous la forme de vacuoles et de sacs ou de tubules. En bas à gauche, une formation stratifiée donne une image en pile d'assiettes. Le noyau excentré, rabougri, n'est pas plus dense que les noyaux normaux. Grossissement: 4800 ×

Le cytoplasme continue ensuite de s'éclaircir, tout en présentant des plages granuleuses, grisâtres, remplies de formations micro-vésiculaires. Comme en même temps les mitochondries, dégénératives, commencent à se raréfier pour finalement disparaître tout à fait, il est possible que ces vésicules ne représentent que le résultat de leur destruction.

La cellule est maintenant franchement dégénérée. Son noyau peut être excentrique, rabougri: sa chromatine reste homogène et n'est pas plus dense que celle des noyaux normaux (Fig. 3, 4). Dans le cytoplasme, où les liposomes sont apparemment moins nombreux, le système réticulo-vacuolaire prend un développement considérable (Fig. 3, 4, 13), il est représenté tout d'abord par les

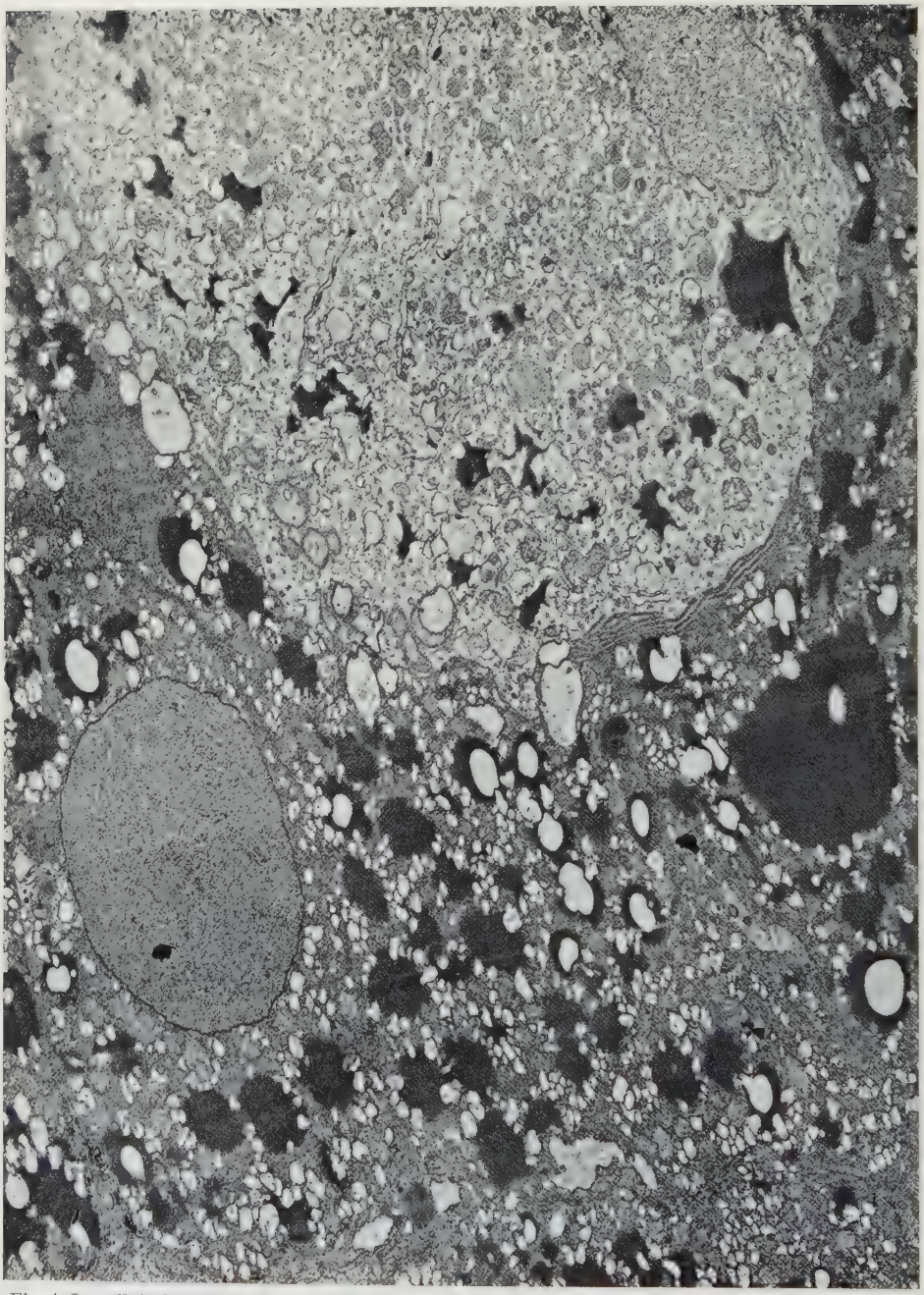

Fig. 4. La cellule dégénérative, « claire », est la même que celle de la fig. 3, mais sur une coupe différente. Elle montre, dans un cytoplasme désorganisé, des mitochondries en voie de destruction et des formations tubulo-sacculaires très particulières. Les liposomes, moins nombreux que dans les cellules voisines, sont de forme irrégulière. Entre cette cellule et les éléments qui l'entourent se développe une formation lamellaire stratifiée, formée de lames claires bordées par deux feuillets osmiophiles. Certains liposomes, dans les cellules « normales », montrent les modifications que l'on rencontre au début de l'évolution vers la dégénérescence. Il s'agit là vraisemblablement d'une modification partielle de ces cellules. Grossissement: 7200 ×

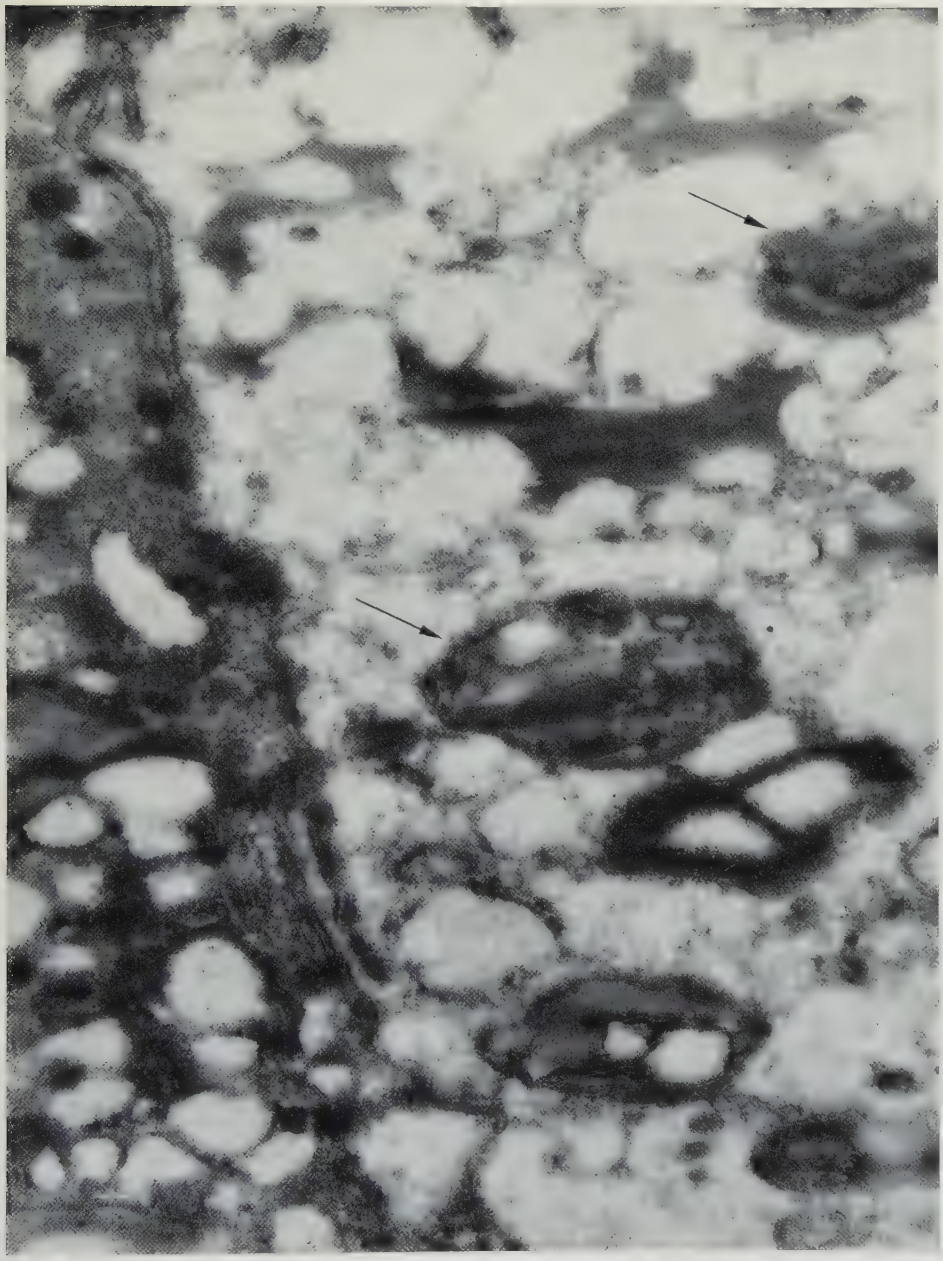

Fig. 5. Zone fasciculée interne, Lapine. Une ébauche de formation lamellaire se remarque dans la zone de contact entre la cellule normale, dense, et la cellule dégénérée. Dans celle-ci, un liposome, dentelé, est entouré de vacuoles, alors que deux autres ont conservé leurs vacuoles centrales osmiophobes. Celui du bas a partiellement perdu son osmiophilie, et montre des densifications membraneuses. Les flèches indiquent deux formations composites, comprenant une structure semblable à un liposome compact, des figures myéliniques et un matériel granulaire. Ces formations correspondent au pigment lipofuscinique. Grossissement: 46 200 ×

vacuoles qui entourent les liposomes (Fig. 6, 9); mais en outre le cytoplasme est truffé de cavités de dimensions diverses, de contour souvent irrégulier, entourées

d'une membrane unique très dense. Il arrive que ces vacuoles soient recouvertes de granulations rappelant les grains de Palade. Elles peuvent aussi contenir des substances figurées, filamenteuses ou granulaires. Tous les intermédiaires existent entre les vacuoles arrondies et les formations tubulo-sacculaires telles

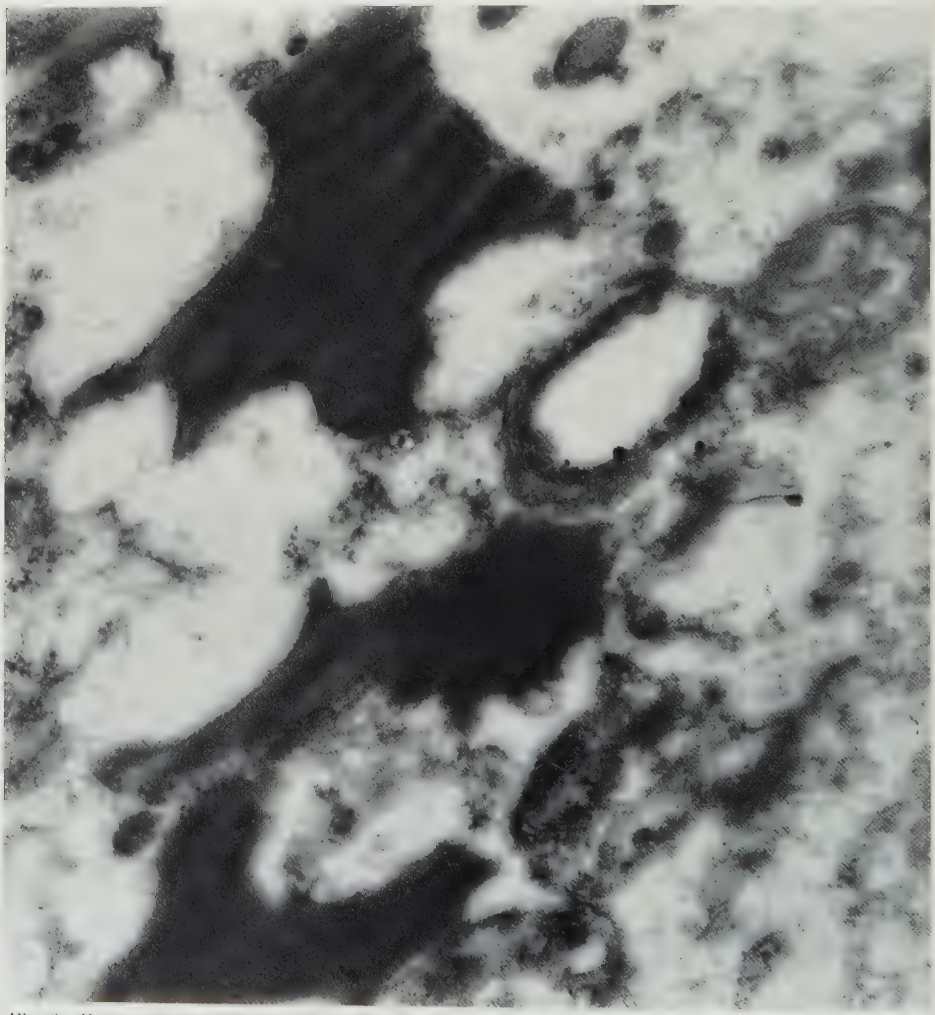

Fig. 6. Zone réticulée, Lapine. Parmi des liposomes compacts, dentelés, entourés de vacuoles, des figures myéliniques (à droite) dessinent des figures irrégulières, ovalaires ou en empreintes digitales. Quelques granulations éparses dans un cytoplasme totalement désorganisé. Grossissement: 46800 ×

qu'on les voit sur la figure 4, tortueuses, larges de 0,05 à 0,3 μ, longues parfois de 3 à 4 μ. Cette cellule cavitaire, rongée, renferme encore des formations lipidiques. Les liposomes sont le plus souvent compacts, de contour irrégulier (Fig. 3, 4, 5, 6, 9). Certains d'entre eux ont conservé leur vacuole centrale, qui peut être optiquement vide (Fig. 5, 9) ou remplie de très fins filaments denses. D'autres ont en grande partie perdu leur osmiophilie (Fig. 5) sauf au niveau de sortes de membranes qui découpent plus ou moins la gouttelette lipidique. On rencontre

souvent des figures myéliniques (Fig. 6, 9), et parfois aussi de ces formations complexes de lipofuscines que l'on trouve dans les couches profondes de la cortico-surrénale, composées de matériel granulaire, de lipides et de figures myéliniques (Cotte, 1959) (Fig. 5, 9).

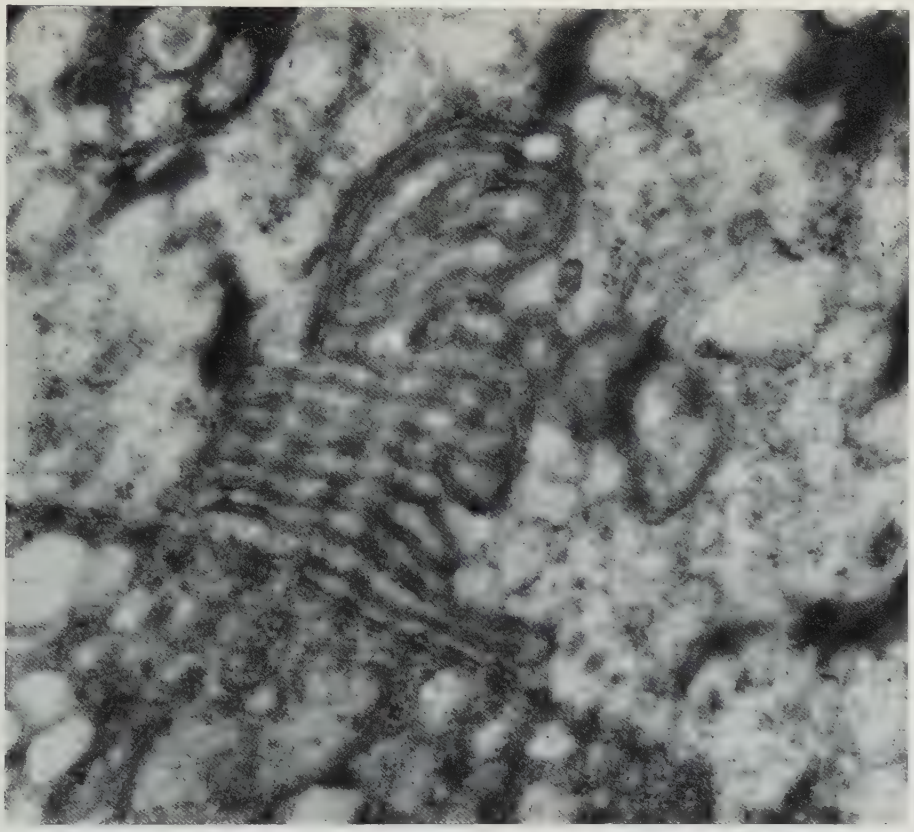

Fig. 7. Zone réticulée, Lapine. Vue d'ensemble d'une formation plurilamellaire stratifiée. Il semble que la cellule normale (en bas) pousse un mince prolongement dans l'axe de la formation, laquelle est formée par le tassement d'une sorte de voile ondulé dont on peut suivre les replis quand l'incidence de coupe est favorable. Grossissement: 46800 ×

Des degrés divers se voient dans cette désorganisation, et il arrive que le cytoplasme ne soit pas modifié au même degré dans toutes ses parties: il existe des sortes de «dégénérescences locales» du cytoplasme. En outre, la répartition des cellules «claires» n'obéit pas à une règle précise. Généralement, elles donnent au parenchyme un aspect «en damier», où les cases blanches seraient bien moins nombreuses que les noires. Mais il n'y a pas de zonation nette quant à l'importance des éléments dégénératifs par rapport aux éléments restés sains. Si les cellules «claires» se remarquent plus facilement dans la zone fasciculée, il se peut que le phénomène soit un peu plus fréquent dans la réticulée, sans qu'une différence nette entre les deux permette de trancher cette question. Tous les animaux n'ont pas autant de cellules «claires», et les variations à ce propos sont considérables. Mais, lorsqu'on observe un nombre suffisant de coupes, chaque animal présente au moins quelques cellules de ce type, dans les espèces étudiées.

La membrane cellulaire elle aussi concourt à donner aux cellules «claires» un aspect morphologique très spécial. On rencontre fréquemment des formations stratifiées qui donnent au faible grossissement (Fig. 3) une image en piles d'assiettes. Le nombre des strates successives est variable, de deux (Fig. 5) à 20 ou plus, et la longueur de chacune peut aller de 0,5 à 4 μ. Les strates paraissent composées de deux feuillets osmiophiles séparés par un espace clair (Fig. 4, 5, 7, 9).

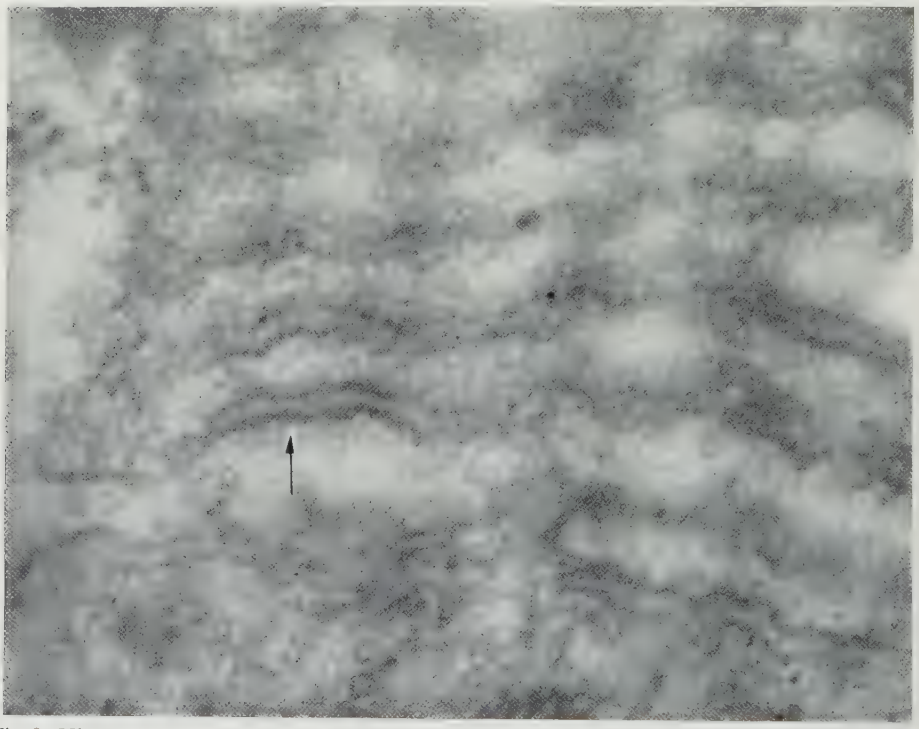

Fig. 8. Même image, vue à un grossissement plus fort. La flèche montre une zone où se voit la structure de chaque lame de cette formation: chaque feuillet dense est composé de deux fines lamelles osmiophiles séparées par un espace osmiophobe très mince. Grossissement: 175000 ×

Une étude à haute résolution (Fig. 8) montre qu'en fait chacun de ces feuillets denses est composé lui-même de deux lamelles osmiophiles de 30 à 40 Å. Parfois, on se rend compte (Fig. 7, 8) que cet empilement est en fait composé des replis d'une lamelle unique. D'autres fois, l'enchevêtrement des éléments lamellaires peut aboutir à des formations concentriques (Fig. 9) ou même à la création de véritables vacuoles. L'origine de ces lamelles n'est pas évidente. Toutefois, il semble bien (Fig. 7, 8) que ces images représentent l'émission par la cellule saine voisine d'un prolongement ou d'un voile qui entre dans la formation lamellaire pour en former l'axe clair de 150 Å. Cette impression est appuyée sur l'existence de nombreuses «épines» (Fig. 10) poussées par les cellules normales dans le cytoplasme des cellules dégénératives, images que l'on ne rencontre jamais dans la zone de contact de deux cellules normales. Peut-être les formations stratifiées ne sont-elles que le résultat de la plicature et du tassement d'«épines» de cet ordre. Quoiqu'il en soit, la signification cytophysiologique de ces images est loin d'être

claire. On peut supposer, à titre d'hypothèse, qu'il s'agit là d'une augmentation de la surface de contact entre les deux cellules, peut-être liée à une résorption de l'eau provenant d'une démixion partielle du protoplasme dégénératif.

Après toutes ces modifications, à la fin de cette évolution, le cytoplasme est devenu presque méconnaissable. La cellule n'est plus qu'un magma de cavités, vacuoles et vésicules, de liposomes tortueux et de granulations diverses. Seule la

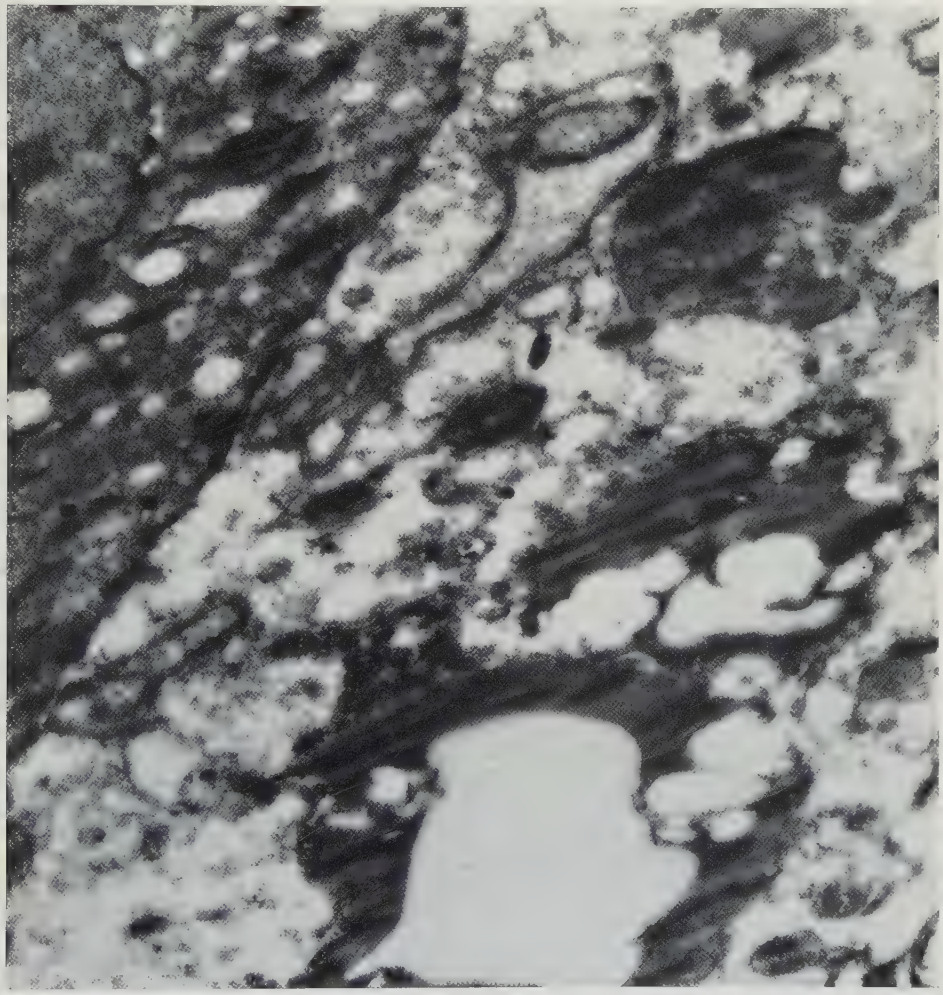

Fig. 9. Zone réticulée, Lapine. L'incidence de coupe donne à la formation lamellaire un aspect de membranes concentriques. Dans le cytoplasme de la cellule dégénérée, une figure myélinique (au centre). Le liposome du bas montre une vacuole centrale osmiophobe, mais des vacuoles plus petites ont creusé sa coque osmiophile. A droite, au milieu un liposome dentelé et en haut une formation composite de type lipofuscine. Grossissement: 27 000 ×

présence des liposomes, que l'on a déjà vu prendre un aspect dentelé dans des cellules proches de la normale, permet de reconnaître dans ces cellules moribondes des éléments du parenchyme glandulaire. Il n'est pas rare de rencontrer aussi des cellules dont une partie semble vidée de son contenu. Là se pose la question du devenir de ces éléments.

2. L'élimination des cellules dégénérées

C'est surtout dans les capillaires de la zone réticulée (Fig. 11, 13, 14) que se rencontrent des débris cellulaires. Ces débris contiennent des restes de mito-

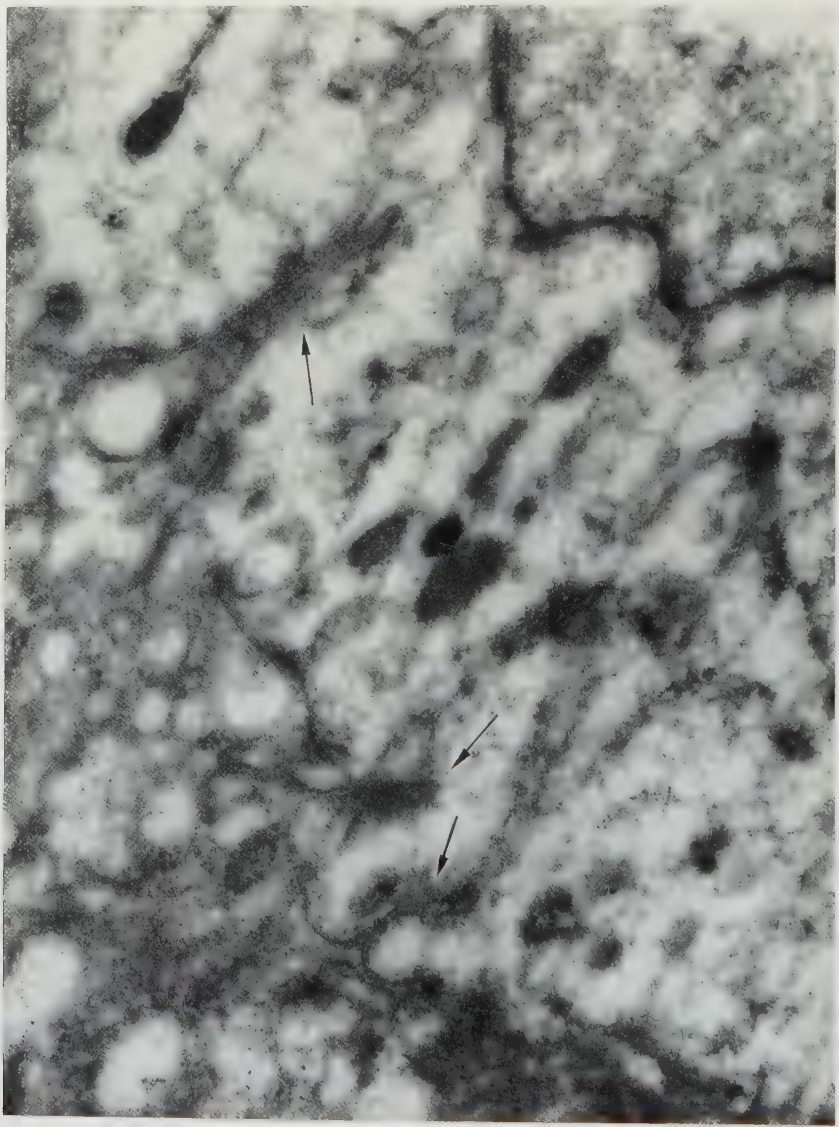

Fig. 10. Zone fasciculée interne, Lapine. Zone de jonction entre une cellule normale (en bas à gauche) et une cellule en voie de dégénérescence. La cellule normale pousse des sortes d'« épines » dans le cytoplasme désorganisé voisin (→). Peut-être est-ce là l'origine des formations lamellaires stratifiées. Grossissement: 42800 ×

chondries, des formations vésiculo-vacuolaires rappelant la structure des cellules dégénératives. Mais surtout, ces éléments sont presque toujours mêlés à des liposomes dont l'aspect est identique à celui des liposomes tortueux et ramifiés que l'on rencontrait dans ces cellules. Il paraît alors peu vraisemblable que

tous ces débris soient autre chose que le résultat de l'élimination totale ou partielle des cellules dégénérées. Et ce d'autant plus qu'il est possible de rencontrer, dans la lumière de vaisseaux plus importants, des cellules entières (Fig. 12), montrant la désorganisation particulière que nous connaissons, chargées de liposomes et de figures myéliniques. Ces cellules, libres dans le courant sanguin, montrent même à leur périphérie des voiles hyaloplasmiques, et sont morpho-

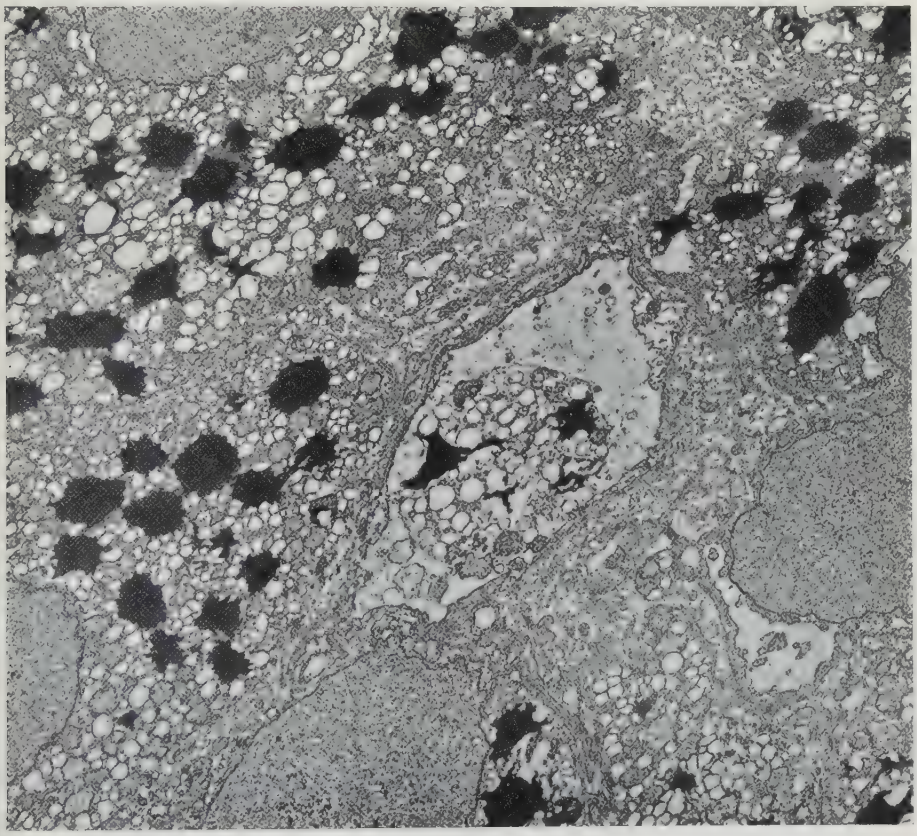

Fig. 11. Zone réticulée, Ratte. Parmi les cellules glandulaires, dont on remarquera les liposomes, compacts dans cette espèce, un capillaire est rempli de débris cellulaires, comportant quatre liposomes modifiés et des mitochondries dégénérées. Grossissement: 5200 ×

logiquement identiques aux éléments dégénérés que nous avons vus dans le parenchyme glandulaire, liés alors aux cellules saines voisines.

Reste alors à savoir comment le contenu cellulaire peut passer dans les capillaires sanguins. On voit par endroits, quand une cellule dégénérée borde un capillaire, l'endothélium de ce vaisseau soulevé par le contenu de la cellule qui s'échappe dans la lumière vasculaire. Les figures 13 et 14 montrent plusieurs aspects possibles de cette expulsion, soit par une ouverture directe de 0,2 à 0,5 μ, soit par soulèvement d'une languette endothéliale (quand le point de rupture de la membrane cellulaire n'est pas situé au niveau du décollement de l'endothélium), soit par une chicane. Les images d'un tel passage sont peu fréquentes. Il est possible que la dégénérescence cellulaire soit un phénomène dont la durée

est bien plus longue que celle de l'expulsion des débris qui en résultent, et que la rareté relative de ces images soit liée à leur fugacité. Il faut aussi que le plan de coupe passe justement par l'étroit passage par où s'écoule le contenu de la cellule. De toutes facons, les restes cytoplasmiques sont libérés dans le torrent circulatoire, et leurs éléments les plus caractéristiques, les liposomes, pourront servir à retrouver leur trace.

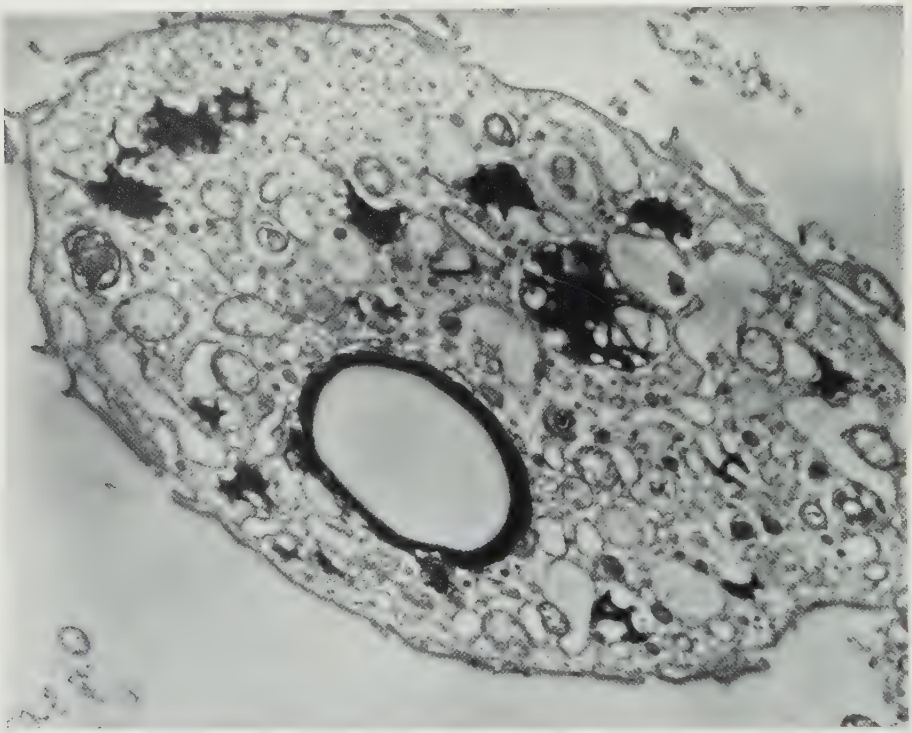

Fig. 12. Zone réticulée juxta-médullaire, Lapine. Il est possible de rencontrer dans la lumière des vaisseaux des cellules entières, au cytoplasme désorganisé, montrant des liposomes dentelés et des figures myéliniques, et semblables aux éléments dégénératifs du parenchyme. Grossissement: 10200 ×

IV. Discussion

a) Récemment, Ehrenbrand (1959) a fait une revue générale de cette dualité d'aspect des cellules de la cortico-surrénale, montrant que ce fait est connu depuis longtemps en microscopie optique. Mais, après inclusion à la paraffine, les éléments dégénératifs sont généralement plus colorables que les cellules normales, et de ce fait sont dits «fuchsinophiles», «sidérophiles», etc. . . . Les aspects opposés des cellules dégénératives dans les deux cas, «sombres» en microscopie optique, «clairs» en microscopie électronique, ne s'expliquent pas aisément. En outre, Mulon (1911) décrivait des cellules très colorables après action de l'acide osmique (précédée, il est vrai, d'une fixation au Bouin), alors que nous les trouvons, avec Lever, très peu colorables après une fixation — coloration par OsO_4 (mélanges de Palade, ou de Dalton pour Lever). Il ne s'agit pas d'une transparence différente aux photons et aux électrons: nos coupes semi-fines de contrôle, avant d'avoir enlevé l'osmium réduit, ou, après son oxydation, en

contraste de phase et après colorations histologiques, montrent toujours que les éléments dégénératifs sont «clairs». Dans le but d'exclure une action éventuelle

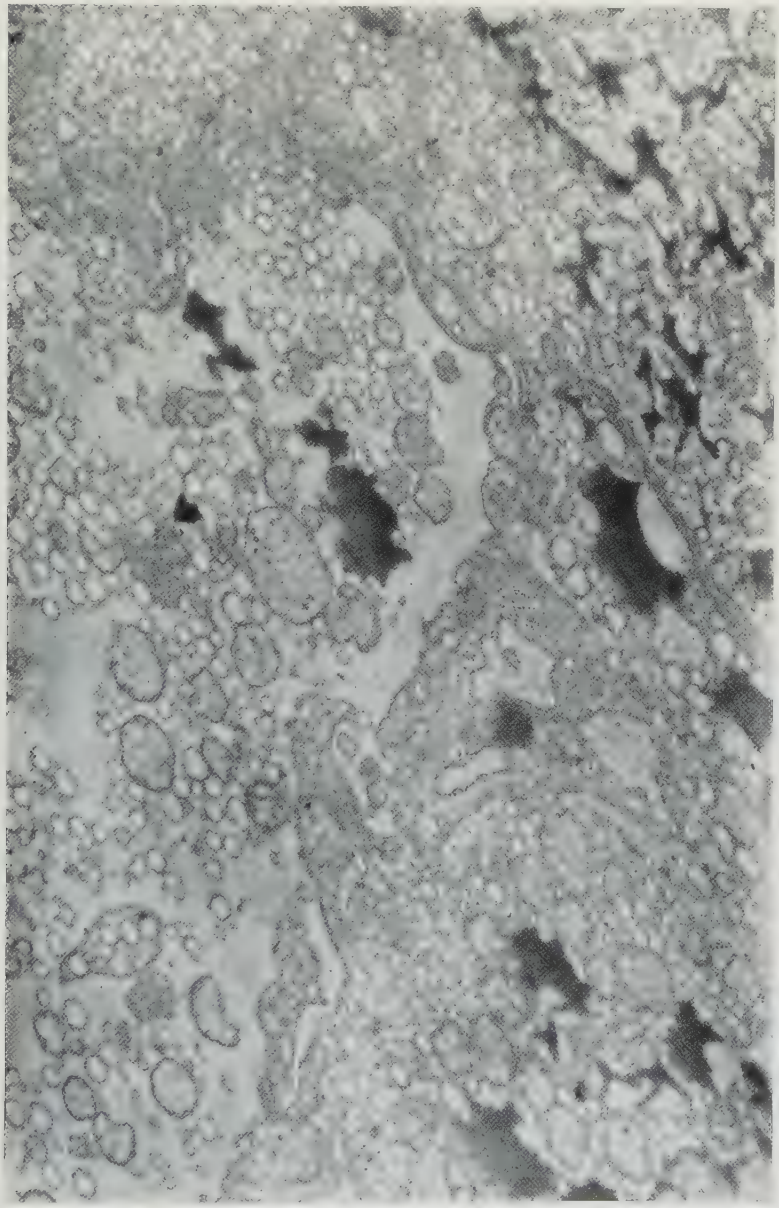

Fig. 13. Zone réticulée, Lapine. Dans le capillaire, à gauche, se trouvent des débris cellulaires divers, en particulier des mitochondries altérées et des liposomes dentelés. Ce capillaire est entouré de cellules dégénérées en cours d'expulsion, dont on remarquera le système vacuolaire. Le passage du contenu cellulaire dans la lumière du vaisseau peut se faire par effraction directe (en haut) ou par soulèvement en sifflet de l'endothélium vasculaire (en bas). Grossissement: 13900 ×

du milieu d'inclusion, nous avons effectué chez des animaux normaux (Cobaye, Lapin) des fixations au Bouin et au Helly suivies d'inclusion à la paraffine.

Nous avons ainsi vérifié que les éléments dégénératifs sont, même par ces techniques, moins colorables que les cellules glandulaires normales. Ceci est très net chez le Lapin, un peu moins chez le Cobaye où parfois des éléments hyperchromophiles existent conjointement avec des cellules «claires». L'explication de ces divergences fera l'objet de recherches ultérieures.

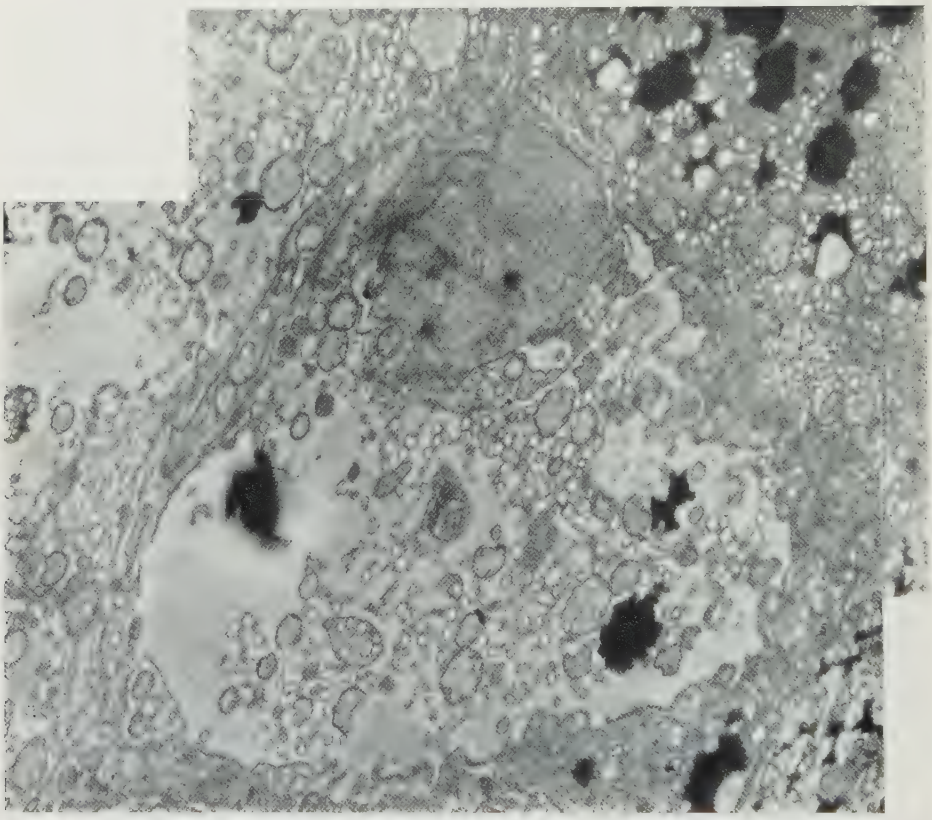

Fig. 14. Zone réticulée, Lapine. La cellule dégénérée, à gauche, est en cours d'élimination. Les débris sont expulsés par une chicane, ouverte entre une languette endothéliale (en haut à gauche) et une cellule endothéliale dont on voit le noyau en haut au centre. Dans la lumière du vaisseau, des liposomes dentelés et des mitochondries altérées sont mêlés à des débris cellulaires peu identifiables. Grossissement: 7500 ×

b) Au premier abord, on peut se demander si ces cellules «dégénérées» ne sont pas en réalité des éléments mal fixés, en particulier quand le réticulum endoplasmique est dilaté et les mitochondries gonflées. Nous ne pensons pas que cet argument puisse nous être opposé. Les formations lamellaires de la périphérie des cellules «claires» ne doivent pas se faire en un instant, et n'existent pas à l'état normal: or toutes nos pièces ont été mises dans le fixateur moins d'une minute après la mort de l'animal, après des manipulations soigneuses pour éviter tout traumatisme important. La zone glomérulaire, prélevée dans les mêmes conditions, ne présente aucune cellule dégénérative. De plus, la disposition en damier de ces cellules semble peu explicable par une mauvaise fixation, qui

atteindrait alors des cellules isolées au sein d'un bloc de tissu bien fixé de moins de 1 mm de coté.

c) Peut-on penser alors qu'un mode holocrine de sécrétion est possible dans la cortico-surrénale ? Celestino da Costa (1913) estimait que l'élimination de débris cellulaires par voie sanguine n'était pas nécessairement la preuve d'une sécrétion holocrine. Mais d'autres auteurs, utilisant aussi le microscope optique, pensaient au contraire qu'une holocrinie cortico-surrénalienne existait vraiment (en particulier Mulon 1902, 1911; Ehrenbrand 1959).

Uotila (1939) n'avait pu modifier l'aspect du cortex surrénal par injection d'extraits anté-hypophysaires. Mais Mosimann (1954), par injection d'oestrogènes de synthèse, provoquait une augmentation considérable des cellules dégénérées et de leur expulsion intra-vasculaire, et pensait qu'il s'agissait là de la simple exagération d'un phénomène physiologique qu'il retrouvait chez les animaux témoins. La présence sur nos préparations de débris cellulaires et même de cellules entières dans la lumière des vaisseaux nous amène à parler de fonte holocrine, car rien ne prouve que ces éléments dégénératifs ne soient pas chargés en produits hormonaux, surtout si on se réfère à l'étude expérimentale de Mosimann.

L'influence hormonale physiologique responsable de cette dégénérescence reste à déterminer; on peut du moins formuler l'hypothèse de travail d'un rôle de la stimulation hypophysaire. En ce cas, des modifications expérimentales de cette stimulation doivent permettre de faire varier la fréquence de ces aspects caractéristiques.

d) La présence de cellules partiellement modifiées, ainsi que l'évolution progressive du type cellulaire normal à l'élément dégénéré, peuvent donner à penser que cette évolution peut parfois être réversible, du moins quand la désorganisation du cytoplasme n'est pas devenue apparemment incompatible avec la survie de la cellule. C'est ce que pensait Lever de ses cellules «claires». Toutefois, nous n'en avons aucune preuve: seule une étude expérimentale permettra peut-être d'apporter des arguments à ce propos.

Conclusion

La présence d'un phénomène dégénératif dans les couches profondes de la cortico-surrénale de 12 animaux normaux donne à penser qu'il existe dans cette glande *un mécanisme physiologique de fonte holocrine*. Cette idée est appuyée sur des images de passage de débris cellulaires dans la lumière des vaisseaux. L'influence qui détermine de telles modifications des cellules glandulaires reste à préciser. Ce sera l'objet d'une étude expérimentale en cours d'exécution.

Bibliographie

Celestino da Costa, A.: Recherches sur l'histophysiologie des glandes surrénales. Arch. Biol. (Liège) **28**, 111—196 (1913).

Cotte, G.: Quelques problèmes posés par l'ultrastructure des lipides de la cortico-surrénale. J. Ultrastruct. Res. **3**, 186—209 (1959).

— Procédé de préparation des membranes de carbone pour la microscopie électronique d'objets biologiques. C.R. Acad. Sci. (Paris) **250**, 621—623 (1960).

Ehrenbrand, F.: Sind die sogenannten „fuchsinophilen" Zellen der Nebennierenrinde spezifische Androgenbildner? Morphologische und histotopochemische Untersuchungen an Meerschweinchen- und Rattenorganen. Acta histochem. (Jena) **7**, 1—73 (1959).

Lever, J. D.: Electron microscopic observations on the adrenal cortex. Amer. J. Anat. **97**, 409—430 (1955).

Mosimann, W.: Zur Frage des Zelluntergangs in der Nebennierenrinde. Acta anat. (Basel) **22**, 379 (1954).

Mulon, P.: Excrétion des capsules surrénales du Cobaye dans les vaisseaux sanguins. C.R. Soc. Biol. (Paris) **54**, 1540—1542 (1902).

— Un processus de sécrétion interne dans la corticale surrénale. C.R. Soc. Biol. (Paris) **70**, 652—654 (1911).

Uotila, U. U.: On the fuchsinophile and pale cells in the adrenal cortex tissue of the fowl. Anat. Rec. **75**, 439—449 (1939).

Dr. Gérard Cotte, Laboratoire d'Histologie, Faculté de Médecine, Boulevard d'Alès, Marseille 5e (France)

Zeitschrift für Zellforschung 54, 199—206 (1961)

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Hamburg
(Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Horstmann)

DIE KAPILLARABSTÄNDE IN VERSCHIEDENEN HIRNREGIONEN DER KATZE

Von

Werner Lierse

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 22. Dezember 1960)

Einleitung

Die hohe Anfälligkeit des Gehirns gegenüber Sauerstoffmangel ist ein auch klinisch bedeutsames Merkmal des Zentralnervensystems. Es werden jedoch nicht alle Hirnteile von einer Hypoxie gleichmäßig betroffen. Altmann und Schubothe (1942) führten Unterdruckversuche an Katzen aus, um die Einwirkung einer Hypoxie auf Teile des Nervensystems zu untersuchen. Nach dem Grad der Schädigung stellten sie eine histotopographische Empfindlichkeitsskala auf. Die ersten Schäden betreffen die Kleinhirnrinde und hier besonders die Rinde des Wurms; es folgen der Nucleus caudatus und das Corpus geniculatum laterale. Die sensiblen Kerne der Medulla oblongata werden eher geschädigt als die motorischen Kerne. Sugar und Gerard (1938) sprechen dem Ammonshorn einen außerordentlichen Grad von Empfindlichkeit gegenüber einem Sauerstoffentzug zu, da die bioelektrischen Potentiale schon 10—12 sec nach Unterbrechung der Sauerstoffzufuhr aufhören. Altmann und Schubothe (1942) machen die unterschiedliche Kapillardichte im Gehirn der Katze neben anderen Faktoren für den bevorzugten Ausfall bestimmter Hirnareale durch Hypoxieschäden verantwortlich. Der mittlere Abstand der Kapillaren kann im Gehirn als Maß der Sauerstoffversorgung einzelner Rinden- oder Kernareale gelten.

Vom Standpunkt der Atmung läßt sich mit Krogh (1919) ein Gewebe als ein System von Gewebszylindern auffassen, in deren Achse die Kapillaren verlaufen. Der Radius eines Gewebszylinders, der von einer Kapillare versorgt wird, kann am anatomischen Präparat auf verschiedene Weise bestimmt werden. Craigie (1920) hat die Gesamtlänge aller Kapillaren in einem definierten Gewebsblock gemessen. Aus diesen Werten errechnete Opitz (1948) den mittleren Abstand der Kapillaren, der danach bei der Katze für die Hirnrinde zwischen 15μ und 20μ und für die weißen Areale zwischen 20μ und 25μ beträgt. Horstmann (1952) zählte in einem 10μ dicken Schnitt alle angeschnittenen Kapillaren eines bestimmten Areales und errechnete daraus den mittleren Kapillarabstand. Die für den präzentralen Cortex gemessenen Werte stimmen mit denen anderer Autoren überein.

Eine detaillierte Analyse der Vaskularisation verschiedener Teile des Zentralnervensystems versuchte Craigie. Er findet beispielsweise die sensiblen Kerne der Medulla oblongata bei Amphibien und einigen Wirbeltieren stärker vaskulari-

siert als die motorischen Kerngebiete. DUNNING und WOLFF (1936) bestimmten die Vaskularisation in verschiedenen Schichten der Parietalrinde und fanden die Lamina IV am besten versorgt. Für das Gehirn der Katze, auf das sich viele experimentelle Arbeiten beziehen, gibt es meines Wissens keine weiteren Angaben über die mittlere Kapillardichte circumscripter Hirnregionen. Wegen der großen Bedeutung lokalisierter Durchblutungsstörungen im Zentralnervensystem versuchte ich eine Methode anzuwenden, die es erlaubt, auch in begrenzten Arealen, z. B. in kleinen Kerngebieten, die Kapillardichte quantitativ an einem beliebigen histologischen Schnitt zu ermitteln, ohne auf Injektionspräparate angewiesen zu sein. Die so gewonnenen quantitativen Aussagen sollen den physiologischen Untersuchungen und Überlegungen eine möglichst einwandfreie anatomische Grundlage geben. Sie bilden damit gleichzeitig eine Ausgangsbasis für weitere Untersuchungen über den Stoffwechsel in einzelnen Hirngebieten. Ich bestimmte den mittleren Kapillarabstand in der Rinde des Parietalhirns, des Gyrus hippocampi, im Thalamus, im Nucleus N. hypoglossi, im Nucleus N. vestibularis und, um ein extrem reich kapillarisiertes Gebiet zu berücksichtigen, die Area postrema der Medulla oblongata. Diese Regionen lassen sich nach ihrer Kapillardichte geordnet in eine Skala eintragen. Der Nucleus N. hypoglossi ist am geringsten kapillarisiert, die Area postrema am besten. Ob aber die Kapillardichte tatsächlich in einem ursächlichen Zusammenhang mit Hypoxieschäden steht, werden erst weitere Untersuchungen zeigen können.

Material und Methoden

Vier Gehirne erwachsener Katzen wurden nach der elektrischen Tötung der Tiere in situ vom Aortenbogen aus mit warmer physiologischer Kochsalzlösung und anschließend mit Bouinscher Flüssigkeit durchspült. Die herausgenommenen Gehirne legte ich dann in die gleiche Fixierungsflüssigkeit ein. Von diesem Material wurden Schnittserien der Medulla oblongata in transversaler Richtung und von der Parietal- und Hippocampusrinde und vom Thalamus in frontaler Richtung hergestellt. Die Einzelschnittdicke betrug 8 μ bis 10 μ. Die Zählungen erfolgten an 10 μ dicken Schnitten, die nach GOLDNER gefärbt waren. Zur Ermittlung des prozentualen Volumenanteils der Kapillaren am Gesamtvolumen der untersuchten Hirnareale benutzte ich die Integrationsmethode nach HENNIG (1956).

Befunde

Mit der erwähnten Integrationsmethode kann das anteilige Volumen einzelner Bestandteile eines Gewebsverbandes innerhalb kurzer Zeit bestimmt werden. Das Zählokular, das hierbei verwendet wird, hat eine „Strich-Punkt-Einteilung" (Integrationsokular I). Ich bestimmte die Trefferzahl der Punkteinteilung für die Kapillaren in der Parietalrinde, im Gyrus hippocampi, im Thalamus, im Nucleus N. hypoglossi, im Nucleus N. vestibularis und in der Area postrema. Die Addition der Treffer von vier Okularfeldern ergibt in erster Annäherung den prozentualen Volumenanteil der Kapillaren am Gewebe. Um den relativen und absoluten Fehler der Zählungen möglichst gering zu halten, sind um so mehr Messungen erforderlich, je weniger Treffer in einem Okularfeld liegen. Von jedem Areal, das ich untersuchte, wurden 200 Okulareinstellungen ausgezählt; 200 Okularstellungen entsprechen 50000 möglichen Treffern. Der relative Fehler ließ sich auf 6,5—9% begrenzen. Die Auszählung von 200 verschiedenen Okularfeldern sind an einem Kern eines Tieres nicht möglich, wenn, um eine größere

Genauigkeit zu erzielen, nicht jeder Schnitt einer Serie ausgezählt wird. Ich habe daher die Messungen jeweils an zwei Gehirnen vorgenommen. Aussagen über eine individuelle Verteilung der Kapillaren können also nicht gemacht werden. Aus diesem Grund wurde bei der Auswahl der Tiere auf gleiches Lebensalter geachtet. Um die Genauigkeit der Trefferwerte zu überprüfen, wurden die Ergebnisse der Zählungen als Summenprozentkurve aufgetragen (Abb. 1). Es ergab sich eine Gaußverteilung. Ich erhielt so das mittlere prozentuale Volumen der Kapillaren am Hirngewebe für die Parietalrinde, den Gyrus hippocampi, den Thalamus, den Nucleus N. hypoglossi, den Nucleus N. vestibularis und die Area postrema. Die Werte sind in der Tabelle 1 aufgezeichnet[1].

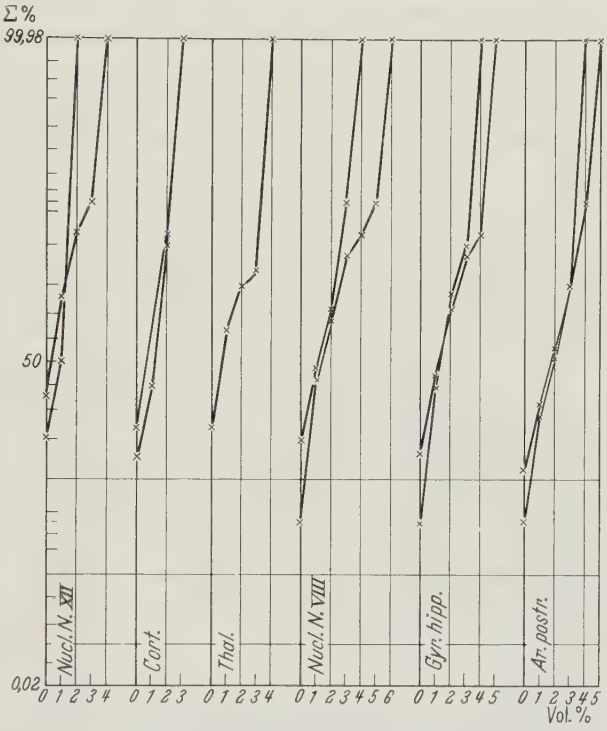

Abb. 1. Summenprozentkurven des prozentualen Kapillarvolumens der untersuchten Hirnregionen

In der Abb. 2 sind die Werte in einer ansteigenden Skala geordnet. Im Nucleus N. hypoglossi ist das anteilige Volumen der Summe aller Kapillaren am Gesamtgewebe am geringsten, die Area postrema ist am besten kapillarisiert. Zwischen beiden Areae liegen mit zunehmender Kapillarisierung die Parietalrinde, der Thalamus, der Nucleus N. vestibularis und der Gyrus hippocampi. Jeder Punkt der Abbildung entspricht den Durchschnittswerten zweier Katzengehirne.

Tabelle 1

Region	Vol.-% Kapillaren/Hirngewebe	
	Katze 1,2	Katze 3,4
Parietalcortex . .	1,5	1,16
Gyrus hippocampi	2,24	2,04
Thalamus	1,72	
Nucl. N. XII .	1,0	1,08
Nucl. N. VIII . .	1,64	2,08
Area postrema .	2,2	2,4

Aus dem prozentualen Volumen der Summe der Kapillaren in den untersuchten Hirnarealen kann durch Umrechnung die *Zahl* der Kapillaren in einem definierten *Gewebsvolumen* ermittelt werden. Da das absolute Volumen der von mir untersuchten Hirnregionen nicht bekannt ist, habe ich einen Gewebsblock von $100 \times 100\,\mu$ Grundfläche und einer Höhe von $10\,\mu$, die der Schnittdicke entspricht, angenommen. Für die Berechnung der Zahl der Kapillaren in diesem definierten Gewebsblock muß aber auch der *Durchmesser der Kapillaren* bekannt

[1] Die Werte wurden rechnerisch ermittelt.

sein. Die Kapillardurchmesser im Gehirn werden in der Literatur unterschiedlich angegeben. LUNA (1924) hat 6,0 μ bis 5,3 μ gemessen, PFEIFER (1928) gibt für das Rhinencephalon 6,4 μ an und OPITZ (1948) errechnete 7 μ. DE VRIES (1934) ermittelte für den Kapillardurchmesser sogar 2 μ bis 7 μ. Nach KROGH (1919) ist der Durchmesser der Kapillaren im lebenden Gewebe oft kleiner als der kleinste Durchmesser der Erythrozyten. Da die Angaben über den Kapillarradius wegen physiologischer bzw. agonaler Veränderungen und wegen der Schrumpfung des fixierten Gewebes unsicher sind, habe ich die Zahl der Kapillaren in dem definierten Gewebsblock für einen angenommenen Kapillardurchmesser von 4 μ, 6 μ und 7 μ errechnet. Die Formel lautet:

$$\frac{V_1}{V_2} = n \qquad (1)$$

n = Zahl der Kapillaren im Gewebsblock.

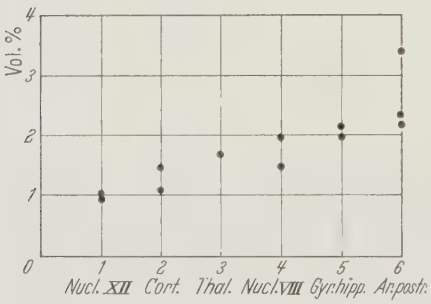

Abb. 2

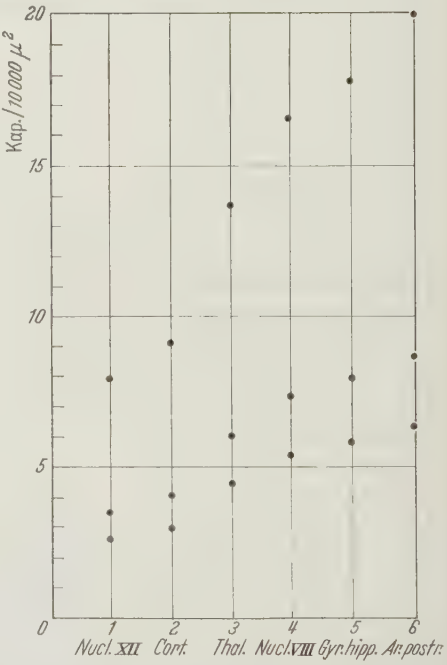

Abb. 3

Abb. 2. Volumprozente der Kapillaren am Hirngewebe. *1* Nucl. N. hypoglossi, *2* Parietalcortex, *3* Thalamus, *4* Nucl. N. vestibularis, *5* Gyrus hippocampi, *6* Area postrema

Abb. 3. Kapillarzahl/10000 μ^2 Hirnfläche. *1* Nucl. N. hypoglossi, *2* Parietalcortex, *3* Thalamus, *4* Nucl. N. vestibularis, *5* Gyrus hippocampi, *6* Area postrema. Der obere Punkt jeder Kolumne entspricht dem Kapillardurchmesser von 4 μ, der mittlere Punkt dem Kapillardurchmesser von 6 μ und der untere Punkt dem Kapillardurchmesser von 7 μ

V_2 = Volumen der einzelnen Kapillare, das sich mit dem Kapillarradius ändert,
V_1 = Gesamtvolumen der Kapillaren im definierten Gewebsblock.

Die Kapillarzahl pro 10000 μ^2 Hirnfläche der untersuchten Regionen ist in der Abb. 3 aufgezeichnet. Unter der Voraussetzung, daß die Kapillaren in den untersuchten Regionen gleichmäßig verteilt sind, kann aus der Zahl der Kapillaren der mittlere Abstand von Mittelpunkt zu Mittelpunkt der Kapillare, ermittelt werden.

$$a = \sqrt{\frac{F}{n}} \qquad (2)$$

Hierbei ist a Abstand der Kapillaren und F Fläche des definierten Gewebsblocks.

In der Formel (2) ist angenommen, daß die Kapillaren in einem Gewebsblock von 10 μ Dicke geradlinig verlaufen. Durch weitere Untersuchungen soll die kritische Grenze der Schnittdicke ermittelt werden.

Durch Halbierung des mittleren Kapillarabstandes a und unter Berücksichtigung des Kapillardurchmessers d ändert sich die Formel (2) und es folgt die Formel (3).

$$r = \frac{1}{2}\sqrt{\frac{F}{n}} - d. \qquad (3)$$

Der Radius (r) des Gewebszylinders, der von einer Kapillare versorgt wird, ist gleich dem Radius des einbeschriebenen Kreises eines Sechseckes. Durch diesen Radius werden tote Winkel, die durch Aneinanderlegen von Kreisen entstehen, nicht erfaßt. Die Abstände der Kapillaren, die durch die Formel (2) ermittelt wurden, sind in der Abb. 4 zusammengefaßt. Der obere Punkt jeder Kolumne gibt den Kapillarabstand bei einem Kapillardurchmesser von 7 μ, der mittlere Punkt entspricht einem Kapillardurchmesser von 6 μ, und der untere einem Kapillardurchmesser von 4 μ. Die Zahlen der Abszisse bezeichnen die untersuchten Regionen. Im Nucleus N. hypoglossi (1) sind die Kapillarabstände am größten. In der Area postrema liegen die Kapillaren sehr dicht beieinander. In der Parietalrinde ist der Kapillarabstand bei einem Kapillardurchmesser von 4 μ bei den Katzen 1 und 2: 29,2 μ und bei den Katzen 3 und 4: 33,3 μ und bei einem Kapillardurchmesser von 7 μ: 50,7 μ bzw. 58,8 μ. Der erste Wert entspricht den Angaben von Pfeifer sowie Dunning und Wolff, der letzte den Angaben von Horstmann und Thews. Das von einer Kapillare zu versorgende Gewebe wird nach Thews (1960) durch eine Säule mit sechseckiger Grundfläche besser erfaßt als durch Zylinder. Der Radius des einbeschriebenen Kreises eines Sechseckes ist der Hälfte des Kapillarabstandes gleichzusetzen. Die Werte des einbeschriebenen Kreisradius sind aber dann zu klein. Die toten Winkel werden besser durch den Radius R des umschreibenden Kreises erfaßt. Es ergeben sich größere Radien (Tabelle 2).

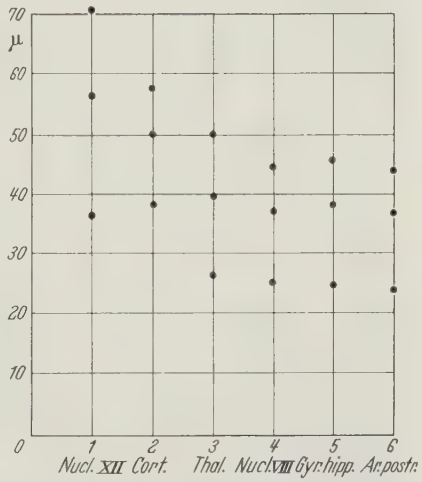

Abb. 4. Mittlerer Kapillarabstand bei verschiedenen Kapillardurchmessern. *1* Nucl. N. hypoglossi, *2* Parietalcortex, *3* Thalamus, *4* Nucl. N. vestibularis, *5* Gyrus hippocampi, *6* Area postrema. Oberer Punkt jeder Kolumne = Kapillardurchmesser 7 μ. Mittlerer Punkt jeder Kolumne = Kapillardurchmesser 6 μ. Unterer Punkt jeder Kolumne = Kapillardurchmesser 4 μ

Tabelle 2

Region	R [μ] bei einem Kapillardurchmesser von					
	4μ		6μ		7μ	
	Katze					
	1, 2	3, 4	1, 2	3, 4	1, 2	3, 4
Nucl. N. XII	22,0	21,2	33,0	37,7	38,5	37,1
Parietalrinde	17,9	20,4	27,0	30,9	31,4	35,9
Thalamus	16,8		25,2		29,3	
Nucl. N. VIII	17,2	15,2	25,8	22,9	29,9	26,7
Hippocampusrinde	14,7	15,3	22,0	23,1	25,7	27,0
Area postrema	14,8	14,2	22,2	21,3	26,0	24,8

Diskussion

Dunning und Wolff (1937) haben, den Angaben Craigies (1920) folgend, die Summe der Kapillarlänge in einem definierten Gewebsblock als „Vascularity“

bezeichnet. Sie gingen von der Vaskularisation der Parietalrinde der Katze aus und beziehen hierauf ihre Werte aus anderen Hirnregionen, peripheren Nerven und Ganglien. Die weiße Substanz des Parietalhirns der Katze ist 2,33mal weniger vaskularisiert als die graue Substanz; der Trigeminusnerv ist 2,11mal weniger und das Ganglion Gasseri 1,7mal weniger als die graue Substanz vaskularisiert. Aus den Angaben von DUNNING und WOLFF lassen sich mit der Formel $r = \frac{1}{2}\sqrt{\frac{1}{L}}$ die Kapillarabstände errechnen. Der mittlere Kapillarabstand in der grauen Substanz ist danach 33,9 μ, in der weißen Substanz 51,8 μ, im peripheren Nerven 49,3 μ, im Ganglion Gasseri 44,2 μ und im Ganglion cervicale superius 36,7 μ. HORSTMANN (1959) errechnete aus der Zahl der Kapillaren in einer bestimmten Fläche den mittleren Abstand der Kapillaren im Cortex der Katze zu 54 μ. Der Abstand ist also größer als der von DUNNING und WOLFF angegebene. Der von HORSTMANN *direkt* ermittelte Kapillarabstand gibt die Möglichkeit, die aus meinen Bestimmungen nicht zu entnehmende Kapillarweite durch Vergleich festzulegen. In der Abb. 4 sind die Kapillarabstände verschiedener Hirnregionen eingezeichnet, wobei hypothetisch die Kapillarweiten von 4 μ, 6 μ und 7 μ eingesetzt sind. Die Abstände bei einer Kapillarweite von 6—7 μ entsprechen den Angaben von HORSTMANN. DUNNING und WOLFF (1936) machen keine Angaben über die Kapillarweite. Ihre Werte der Kapillarabstände passen zu den von mir ermittelten am besten, wenn ein — nicht richtiger — Kapillardurchmesser von 4 μ vorliegt. Die Abb. 5 hat also nur vergleichenden Wert. In der Abb. 5 habe ich die Kapillarabstände bei einem Kapillardurchmesser von 4 μ nach den Angaben von DUNNING und WOLFF und meinen Werten zusammengestellt. Den größten Kapillarabstand haben danach die peripheren Teile des Zentralnervenssystems; es folgen der Nucl. N. hypoglossi, die Parietalrinde, der Thalamus, der Nucl. N. vestibularis, der Gyrus hippocampi und die Area postrema.

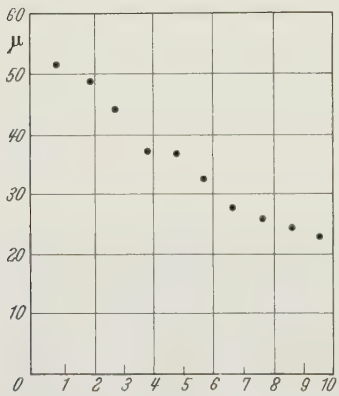

Abb. 5. Kapillarabstände bei einem Kapillardurchmesser von 4 μ in verschiedenen Hirnregionen der Katze (*1*—*4* umgerechnet nach DUNNING und WOLFF). *1* Weiße Substanz des Parietalhirns, *2* Trigeminusnerv, *3* Ganglion Gasseri, *4* Ganglion cerv. sup., *5* Nucl. N. hypoglossi, *6* Parietalcortex, *7* Thalamus, *8* Nucl. N. vestibularis, *9* Gyrus hippocampi, *10* Area postrema

Bei allen physiologischen Überlegungen macht sich störend bemerkbar, daß die Kapillarweite im *lebenden* Gewebe nicht bekannt ist. Für den Vergleich am histologischen Präparat der Messungen von HORSTMANN und mir hat sich die Annahme des Kapillardurchmessers von 6 μ bewährt. Aber in beiden Fällen handelt es sich um Schnittpräparate, die eine schwer überschaubare Ungenauigkeit durch postmortale Kontraktion und Schrumpfung enthalten; sie ließe sich nur durch Messungen am unbeeinflußten lebenden Gewebe beseitigen. Nach KROGH (1919) sind die Kapillaren im lebenden Gewebe oft enger als der kleinste Durchmesser der Erythrozyten. In Notständen werden die Kapillaren erweitert. Für einen längeren Zeitraum wird ein mittlerer Kapillardurchmesser von 6—7 μ der Wirklichkeit am nächsten kommen. Nach THEWS (1960) liegt der letale Grenz-

wert des Gewebszylinderradius, der noch von einer Kapillare mit einem Durchmesser von 7 μ versorgt wird, zwischen 19 μ und 21 μ. Bei einem Sauerstoffdruck von 30 mm Hg treten erste Reaktionen auf (Reaktionsschwelle) und eine Kapillare kann einen Gewebszylinder mit einem Radius von 30 μ versorgen (vgl. Opitz 1948). Bei dem Sauerstoffpartialdruck von 30 mm Hg (Reaktionsschwelle) ist kein anatomisch sichtbarer Ausfall zu erwarten, da die untersuchten Areae alle kleinere Gewebszylinder haben. Nach Thews (1960) tritt bei einem Sauerstoffpartialdruck, der der Reaktionsschwelle entspricht, eben eine Untersättigung des Atmungsfermentes ein. Bei einer Annäherung des Sauerstoffpartialdrucks an die letale Schwelle müßten nun am ehesten diejenigen Kerngebiete ausfallen, in denen der anatomische Gewebszylinder, also der Kapillarabstand, am größten ist. Es wäre danach zu erwarten, daß die ersten Ausfallserscheinungen im Nucleus N. hypoglossi auftreten. Nach Altmann und Schubothe dagegen fallen zuerst die Kleinhirn- und Großhirnrinde, erst viel später die Kerne der Medulla oblongata und hier besonders spät die sensiblen Kerngruppen aus. Die Hypoxieschäden sind also dem Kapillarabstand nicht direkt proportional. Eher scheinen sie umgekehrt proportional zu sein; aber sicher wird ein Hypoxieschaden durch den Sauerstoffbedarf bestimmt. Da über den tatsächlichen Verbrauch circumscripter Hirnareale meines Wissens nichts bekannt ist, kann der Abstand der Kapillaren im Gehirn nur als Anhalt für den wahrscheinlichen Sauerstoffverbrauch gewertet werden. Die quantitative Bestimmung dieser anatomischen Daten erweist sich aber als notwendige Grundlage zur Beurteilung physiologischer Fragestellungen und Ergebnisse.

Zusammenfassung

In vier Katzengehirnen wurde der mittlere Kapillarabstand aus dem prozentualen Volumenanteil der Kapillaren am Hirngewebe bestimmt. Der Kapillarabstand ist im Nucleus N. hypoglossi am größten, in der Area postrema der Medulla oblongata am kleinsten. Zwischen beiden Regionen liegen die Werte der Parietalrinde, des Thalamus, des Nucleus N. vestibularis und des Gyrus hippocampi. Diese anatomischen Daten können in die Formeln zur physiologischen Berechnung des Sauerstoffverbrauchs begrenzter Hirnregionen eingesetzt werden und sind eine Fortführung der quantitativen Untersuchungen über die Angioarchitektonik des Gehirns.

Literatur

Altmann, H. W., u. H. Schubothe: Funktionelle und organische Schädigungen des Zentralnervensystems der Katze im Unterdruckexperiment. Beitr. path. Anat. **107**, 3—116 (1942).

Craigie, E. H.: On the relative vascularity of various parts of the central nervous system of the albino rat. J. comp. Neurol. **31**, 429—464 (1920).

Dunning, H. S., and H. G. Wolff: The relative vascularity of the trigeminal ganglion and nerve, cerebral cortex and white matter. Trans. Amer. neurol Ass. **62**, 150—154 (1936).

— — The relative vascularity of various parts of the central and peripheral nervous system of the cat and its relation to function. J. comp. Neurol. **67**, 433—450 (1937).

Hennig, A.: Kritische Betrachtungen zur Volumen- und Oberflächenmessung in der Mikroskopie. Zeiß-Werkzeitschrift Nr. 30, 3—12.

Horstmann, E.: Abstand und Durchmesser der Kapillaren im Zentralnervensystem verschiedener Wirbeltierklassen. Meeting of Neurobiologists, Amsterdam 1959, S. 59—63.

Krogh, A.: The number and distribution of capillaries in muscels with calculations of the oxygen pressurehead necessary for supplying the tissue. J. Physiol. (Lond.) **52**, 409–415 (1919).

— The supply of oxygen to the tissue and the regulation of the capillary circulation. J. Physiol. (Lond.) **52**, 457—474 (1919).

Luna, E.: Studi sulla morfologia delle arterie dell'encephalo. II. Morfologia e morfogenesi delle arterie profonde del bulbo e del ponte. Ric. lab. anat. norm. Univ. Roma **19**, 197—220 (1919).

— Primo saggio di uno studio sulla grandezza dei vasi sanguiferi. Arch. ital. Anat. Embriol. **21**, 87—96 (1924).

Opitz, E.: Über die Sauerstoffversorgung des Zentralnervensystems. Naturwissenschaften **35**, 80—88 (1948).

Pfeifer, R. A.: Die Angioarchitektonik der Großhirnrinde. Berlin: Springer 1928.

Sugar, O., and R. W. Gerard: Anoxia and brain potentials. J. Neurophysiol. **1**, 558 (1958). Zit. nach Altmann u. Schubothe.

Thews, G.: Die Sauerstoffdiffusion im Gehirn. Pflügers Arch. ges. Physiol. **271**, 197—226 (1960).

Vries, E. de: Laminar injection of brain capillaries in cats. Psychiat. neurol. Bl. Amst. **1934**, (Feestbundel Kappers), 712—722.

Dr. Werner Lierse, Anatomisches Institut der Universität Hamburg, Hamburg-Eppendorf, Martinistraße 52

Zeitschrift für Zellforschung 54, 207—237 (1961)

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Münster (Westf.)
(Direktor: Prof. Dr. Dr. H. Becher)

MORPHOLOGISCH-EXPERIMENTELLER BEITRAG ZUM LICHTMIKROSKOPISCHEN BAU DES VEGETATIVEN NERVENSYSTEMS

I. Mitteilung*

DIE ENDIGUNGSWEISE DER PRÄGANGLIONÄREN NERVENFASERN

Von

H. Knoche

Mit 13 Textabbildungen

(Eingegangen am 23. Januar 1961)

Einleitung

Als Resultat langjähriger Untersuchungen an der vegetativen, nervösen Peripherie ist die Darstellung eines nervösen Netzes zu verzeichnen. Es ist vor allem Stöhr (1928—1960) und Boeke (1927—1951) sowie ihren Mitarbeitern zu verdanken, die Feinheit und Fülle nervöser Substanz im Endausbreitungsgebiet vegetativer Nervenfasern gezeigt zu haben. Hierzu dienten vornehmlich Silbermethoden. Auch die von anderen Autoren (Hillarp 1946, Mitchel 1950, Spanner 1929, Schabadasch 1930, Meyjling 1938 u. a.) angewandte Methylenblautechnik hat zur Klärung der lichtmikroskopischen Bauweise und Ausbreitung vegetativer Nervenzellen und Fasern wesentlich beigetragen. Unter Vermeidung einer Fixierung läßt sich durch die native Einschlußfärbung mit saurem Hämatoxylin nach Ehrlich (Feyrter 1951) ein anscheinend syncytiales, kernhaltiges Plasma sichtbar machen, in dem vegetative Nervenfasern und Neurofibrillen verlaufen. Die Vorstellung, eine vegetative Nervenfaser finde in Gestalt eines Ringes oder Kolbens am Erfolgsplasma ihr Ende, verlor durch die Befunde Stöhrs und Boekes erheblich an Bedeutung. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, ob eine vegetative Nervenfaser an „nicht nervösem" Plasma oder an einer Nervenzelle endigt. Das von Stöhr und Reiser (1932) gezeigte nervöse Terminalreticulum soll nicht nur in ubiquitärer Ausbreitung das lichtmikroskopisch faßbare Substrat der interneuronalen Synapse und die funktionelle Verbindung von Nervensystem und nicht nervösem Erfolgsplasma verkörpern, sondern auch mit den zu innervierenden Zellen plasmatisch verbunden sein. Daher ist nach den deskriptiven Untersuchungen Stöhrs das gesamte vegetative Nervensystem als ein riesiges Syncytium aufzufassen, in dem die Zell- und Faserelemente alle untereinander und außerdem durch das nervöse Terminalreticulum mit den nicht nervösen Erfolgszellen plasmatisch verschmolzen sind. Der Behauptung, das Terminalreticulum sei ein *Netz* von Neurofibrillen oder feinsten vegetativen Nervenfasern, ist von zahlreichen Autoren ebenso widersprochen worden wie der Aussage, das vegetative Endnetz sei mit dem Erfolgsplasma vereinigt (De Castro 1932—1950, Lawrentjew 1925—1934, Herzog 1926—1955, Jabonero 1946 bis 1960, Kirsche 1954—1958, Abraham 1938—1960, Schimert 1935—1957, Spatz

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

1952 u.a.). Während Kirsche überhaupt den nervösen Charakter des Terminalreticulums bezweifelt und es als bindegewebige Struktur betrachtet, gibt Jabonero mit zahlreichen eigenen Präparaten zu, daß die vegetativen Endfasern und Fibrillen netzartig verknüpft sein können. Der Autor hebt außerdem die vakuolige Beschaffenheit des die Fibrillen oder dünnkalibrigen Nervenfasern tragenden Plasmas hervor und schließt daraus auf eine sekretorische Tätigkeit der vegetativen Endformation.

Die von Stöhr nahezu 30 Jahre durchgeführten Untersuchungen am Terminalreticulum haben zahlreiche Autoren veranlaßt, ebenfalls zur Klärung des Baues der vegetativen, nervösen Peripherie mit verschiedenen Methoden und unter Berücksichtigung unterschiedlicher Fragestellungen beizutragen. Dennoch war es bisher nicht möglich, auf Grund lichtmikroskopischer Befunde zu einer übereinstimmenden Definition des Aufbaues der vegetativen, nervösen Peripherie zu kommen.

Obwohl nach der Beschreibung eines Terminalreticulums durch Stöhr, Reiser und Sunder-Plasmann (1935—1953) zahlreiche, durch gewissenhafte Untersuchungen begründete Einwände gegen die Deutung des vegetativen Endnetzes erhoben wurden, haben die genannten Autoren ihre Anschauung nur wenig oder gar nicht geändert oder erweitert. Nach einer 1932 geäußerten Auffassung Stöhrs „verdankt das Terminalreticulum seine Entstehung einer wabenartigen Aufsplitterung feinster Nervenfäserchen, das mit zahlreichen Einzelelementen in das Sarkoplasma hineinversenkt ist". Reiser behauptete damals: „Das Terminalreticulum ist wahrscheinlich als ein Zwischengewebe anzusehen, das gleichzeitig Elemente des Nervensystems und die des innervierten Gewebes in kontinuierlichen, fließenden Zusammenhang bringt, so daß ein scharf abgrenzbares Ende der nervösen Substanz nicht zu erkennen ist." In Handbuchbeiträgen haben Stöhr (1957) und Reiser (1959) ihre histologischen Resultate und Auffassungen nochmals dargelegt: Reiser: „Das vegetative Nervensystem stellt ein ausgedehntes Syncytium dar. Die Nervenzellen stehen untereinander durch breite Plasmabrücken, durch anastomosierende Zellfortsätze, durch das zwischen den Ganglien gelegene und mit dem intracellulären Fibrillenapparat in Verbindung stehende Fasernetz sowie durch das Terminalreticulum in kontinuierlichem Zusammenhang." „Alle in einem Organ verlaufenden Nervenfasern, Fortsätze einer unschätzbaren Anzahl verschiedener Ganglienzellen des Sympathicus und Parasympathicus, münden mit ihren Aufzweigungen in ein ausgedehntes gemeinsames Netzwerk, in das nervöse Terminalreticulum" usw.

Die Meinung Stöhrs läßt sich folgendermaßen ausdrücken: Ein aus dem Schwannschen Leitgewebe und interstitiellen Zellen zusammengesetztes Maschenwerk enthält netzartig verknüpfte marklose Nervenfasern und Neurofibrillen, die mit den Erfolgszellen (nicht nervöser Natur) plasmatisch verbunden sind. Zur interneuronalen Synapse zählt der Autor die Oberfläche der Ganglienzellen, die Hüllzellen und ein aus der Aufsplitterung präganglionärer Nervenfasern hervorgegangenes Nervennetz.

In letzter Zeit hat sich besonders Jabonero um die histologische Erforschung des vegetativen Nervensystems bemüht. Nach seinen Resultaten besteht das vegetative Nervensystem aus zwei unterschiedlich gebauten Bezirken: 1. Neuronaler Aufbau der sympathischen Ganglien. Die präganglionären Nervenfasern

endigen ösen- oder ringförmig im syncytialen Satellitenplasma, mit dem sie verschmelzen sollen. 2. Syncytiale Bauweise der vegetativen Peripherie: an nicht nervösen Erfolgszellen existiert ein nervöses Syncytium, das keine innige Beziehung mit den zu innervierenden Zellen aufnimmt. Die von Jabonero einerseits mit Gründlichkeit und Konsequenz durchgeführten Untersuchungen enthalten andererseits erhebliche Widersprüche, auf die noch näher einzugehen ist.

Nach den Ergebnissen der angeführten Autoren und eigenen früheren und neuen Befunden (Knoche 1950—1960) ergeben sich bezüglich der Endigungsweise der präganglionären Nervenfasern von selbst folgende Fragestellungen, die sich zum Teil lichtmikroskopisch, manchmal jedoch nur elektronenmikroskopisch beantworten lassen:

a) Endigung der präganglionären Nervenfasern in Gestalt eines Netzes, von Ringen, Ösen, Kolben, Spiralfasern oder von pericellulären Faserkörben?

b) Plasmatische Verbindung oder Kontakt von präsynaptischen Nervenfasern mit den Ganglienzellen oder mit dem Hüllgewebe?

c) Verhalten der Endigungen der präganglionären Nervenfasern nach experimentellen Eingriffen und in erkrankten sympathischen Ganglien.

In einer II. Mitteilung soll außerdem das Verhalten der vegetativen Endformation am nicht nervösen Erfolgsplasma besprochen werden.

Material und Methodik

An einem umfangreichen Material konnte das Endgebiet prä- und postganglionärer Nervenfasern am normalen und erkrankten menschlichen sowie am normalen und experimentell veränderten vegetativen Nervensystem von Tieren untersucht werden. Zur Untersuchung gelangten: **1.** 118 sympathische Ganglien: a) Ganglion cervicale craniale und Ganglion stellatum vom Menschen (normal und bei Endangitis obliterans, Morbus Raynaud, essentieller Hypertonie, Angina pectoris). b) Ganglion cervicale craniale von 60 Katzen, 4 Hunden und 12 Kaninchen (normal und nach Durchschneidung prä- oder postganglionärer Nervenfasern). **2.** a) Mensch: 15 Mägen (normal, Ulcus, Carcinom), 12 Dünndarmabschnitte (normal, Ulcus, Ileus), 18 Appendices (normal, Appendiocopathia neuromatosa). b) Magen-Darm-Kanal von 8 Hunden, 10 Katzen und 18 Kaninchen (normal, nach örtlicher oder intravenöser Zufuhr von Nikotin). **3.** Nickhäute von 32 Katzen und 6 Kaninchen (normal sowie nach Exstirpation des Ganglion cervicale superius.

Folgende histologische Techniken kamen zur Anwendung: Silberimprägnation nach Bielschowsky-Gros, außerdem in der Modifikation nach Feyrter, nach Sunder-Plassmann; Silbercarbonat-Methode nach Jabonero; native Einschlußfärbung nach Feyrter sowie Markscheidenfärbungen. Fixierung: 10—20%iges Formalin, A.F.A.-Gemisch nach Lawrentjew. Zum Teil wurde bei Hunden, Katzen und Kaninchen in Narkose eine Durchspülung mit körperwarmer physiologischer Kochsalzlösung und anschließend mit einem Fixierungsmittel vom Herzen aus durchgeführt.

Befunde

In Untersuchungen zahlreicher sympathischer Ganglien von Mensch und Tier ließ sich stets ein cellulärer Aufbau feststellen. Die multipolaren Ganglienzellen sind gut gegeneinander abgrenzbar, eine Verbindung von Nervenzellen durch Plasmabrücken oder durch anastomosierende Fortsätze war nicht zu beobachten. Die von Harting (1931) in der Wand der Gallenblase und von Hermann (1948—1954) in den Herzganglien gezeigten anastomosierenden Nervenzellen dürfen als Einzelbefunde und nicht als Ausdruck einer grundsätzlichen syncytialen Bauweise des sympathischen Nervensystems betrachtet werden. Ebenso selten wie in

Sympathicusganglien hat Hild (1954) im sekretorischen Nucleus supraopticus des vegetativen Hypothalamus vereinzelt anastomosierende Nervenzellen gefunden, ohne daraus einen syncytialen Aufbau des Nervensystems zu folgern.

Die von verschiedenen Autoren (Dogiel 1899; Bielschowsky 1904/05; Stöhr 1923, 1937; Cole 1930; Suzuki 1936; Glees 1933; Boeke 1935, 1937; Ottaviani 1940; Seto und Fukuyama 1936; Reiser 1932; Kölliker 1896; Michailow 1908; E. Müller 1920, 1923; Lawrentjew 1929; Kolossow und Iwanow 1930; Baron 1932; Sunder-Plassmann 1933; Pines und Narowtschatowa 1934; Rieder 1935; Sabussow und Ssuslikow 1936, 1937; Szantroch 1936; Greving 1952; Landau 1956) im zentralen und vegetativen Nervensystem in sehr geringer Zahl dargestellten direkten Verbindungen von benachbarten Ganglienzellen können nicht als Beispiele für den normalen, allgemein gültigen Bauplan des Nervensystems gewählt werden. Die nachgewiesenen Anastomosen zwischen sympathischen Nervenzellen haben als Einzelbefunde zu gelten und sind für den Gesamtaufbau des sympathischen Nervensystems aus Einzelelementen zunächst von untergeordneter Bedeutung.

Nach Stöhr und Reiser erstreckt sich zwischen den Nervenzellen eines sympathischen Ganglions ein Fasernetz, das durch Aufzweigung markloser Nervenfasern und anschließender Anastomosenbildung entstanden ist. Dieses Terminalreticulum soll nach Ansicht beider Autoren kontinuierlich in das Fibrillengerüst der Ganglienzellen übergehen. Während Reiser (1959) an dieser Behauptung festhält, hat Stöhr (1957) seine Anschauung etwas geändert und die Oberfläche der Nervenzellen, ihr Hüllgewebe und ein Endnetz präganglionärer Nervenfasern als interneuronale Synapse bezeichnet. Allerdings vermag sich der Autor nicht ganz von seiner früheren Vorstellung zu trennen, da Neurofibrillen, die den präganglionären Nervenfasern und den Fortsätzen der Nervenzellen selbst entstammen, doch für eine plasmatische Verbindung der Nervenzellen sorgen. Danach ist wiederum eine plasmatische Kontinuität zwischen präganglionären Nervenfasern und Nervenzellen vorhanden, auch wenn sie nicht wie früher am Perikaryon, sondern im Bereich der Fortsätze der Ganglienzellen lokalisiert ist. Nach eigenen Beobachtungen breiten sich zwischen den sympathischen Nervenzellen sehr feinkalibrige, lichtmikroskopisch gerade noch erkennbare Nervenfasern aus, deren Herkunft sehr schwer zu ermitteln ist. Sie verlaufen teilweise gestreckt, vielfach wellenförmig, zeigen über weite Strecken eine spiralige oder schlingenartige Anordnung und können sich überkreuzen. Dieses intercelluläre Fasergerüst nimmt stellenweise engen Kontakt mit den Nervenzellen, ihren Fortsätzen und mit dem Hüllgewebe auf. Das Faserwerk kann sehr dicht gefügt sein, aber auch aufgelockert vorliegen und benachbarte Nervenzellen gleichzeitig umhüllen. An der Entwicklung des erwähnten Faserapparates werden in Übereinstimmung mit Stöhr und Reiser wahrscheinlich präganglionäre Nervenfasern und vielleicht auch die Dendritenausläufer der sympathischen Nervenzellen beteiligt sein. Allerdings lassen sich weder eine Netzbildung von Ästen einer oder mehrerer präganglionärer Nervenfasern untereinander noch plasmatische Anastomosen zwischen präganglionären Nervenelementen und Dendriten der Ganglienzellen nachweisen. Außerdem habe ich niemals eine einwandfreie Verbindung präganglionärer Nervenfasern mit dem Fibrillengerüst der Nervenzellen beobachtet. Die Anteile des intercellulären Fasergerüstes können den Nervenzellen und ihren Fortsätzen zwar sehr dicht anliegen, jedoch ist an keiner Stelle eine gegenseitige plasmatische Verschmelzung mit Sicherheit wahrnehmbar.

Die dem oberen sympathischen Halsganglion einer Katze entnommene Ganglienzelle der Abb. 1 ist am Perikaryon und an ihren Fortsätzen von sehr feinen Nervenfasern umgeben, die dem intercellulären Fasergefüge einzuordnen sind. Manche marklose Nervenfasern umgeben die Fortsätze spiralig, andere verlaufen im Gebiet des Hüllgewebes oder an der Oberfläche des Zellkörpers. An keiner Stelle ist eine netzartige Verknüpfung oder ein Eindringen der Nervenfasern in die Ganglienzelle bemerkbar. Die Anhäufung der marklosen Nervenfasern im Bereich der Nervenzellfortsätze läßt an eine morphologische und funktionelle Koppelung erstens von Dendriten verschiedener Nervenzellen untereinander und zweitens von Dendriten und präganglionären Nervenfasern denken. Außerdem könnte man in dem mit *r* bezeichneten ringartigen Gebilde am Ende einer sehr dünnen Nervenfaser die Endigungsform einer präganglionären Nervenfaser oder eines Dendriten einer anderen Nervenzelle erblicken. Es gelingt nicht immer, an einer Nervenzelle die sehr feinkalibrigen Nervenfasern und gleichzeitig eine oder mehrere ringförmige Endigungen zur Darstellung zu bringen. Einmal können der Faserapparat und Endring fehlen, andererseits sind nur ein Fasergerüst oder nur eine bzw. einige ringartige Endigungen vorhanden. Diese quantitativen Unterschiede können meines Erachtens normalerweise vorliegen, durch den Funktionszustand des Nervensystems oder durch die Schnittführung begründet sein. Sehr oft sind die

Abb. 1. Feinkalibrige Nervenfasern und ringartige Endigung an einer Nervenzelle. Ganglion cervicale sup. Katze. Bielschowsky-Feyrter-Methode. *r* Ringartige Endigung; *f* feinkalibrige, marklose Nervenfasern; *k* Kerne der Hüllzellen; etwa 1800mal vergr., auf $^4/_5$ verkleinert

Begrenzungen der Endringe außerordentlich dünn und schwer imprägnierbar, so daß sie nur bei stärkster lichtmikroskopischer Vergrößerung gerade noch zu erkennen sind. In Abb. 2 erblickt man einen kleinen Endring unmittelbar am Perikaryon einer Nervenzelle vom Ganglion cervicale sup. einer Katze. Leider kommt auf der Photographie bei r_1 die Faser des Endringes nicht so deutlich zum Ausdruck wie auf einer histologischen Zeichnung. Gelegentlich befinden sich auch isolierte, von ihren Nervenfasern scheinbar abgetrennte Ringe oder Ösen am Perikaryon, an den Nervenzellfortsätzen oder am Hüllgewebe. Es läßt sich in diesem Falle vorläufig nicht entscheiden, ob die Ringe tatsächlich einmal isoliert auftreten

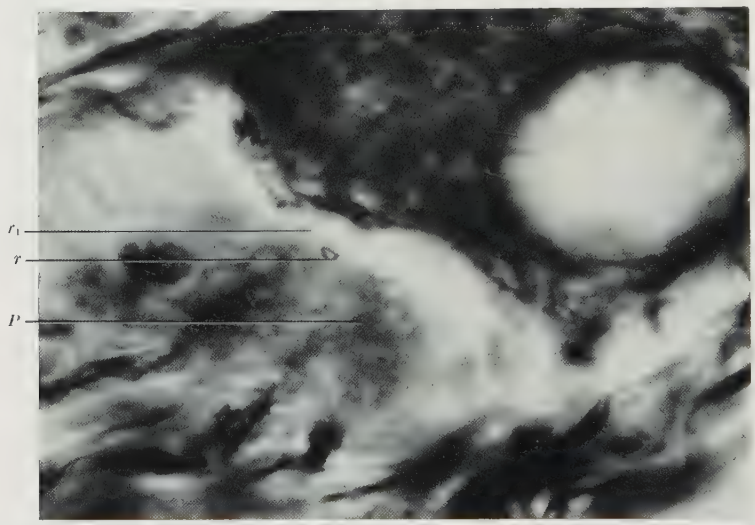

Abb. 2. Ringartige Endigung am Perikaryon einer sympathischen Nervenzelle. Ganglion cervicale sup. Katze. Bielschowsky-Feyrter-Methode. r_1 Präsynaptische Faserstrecke; r Endring; P Perikaryon; etwa 1800mal vergr., auf $^9/_{10}$ verkleinert

können, ob andererseits die entsprechenden Nervenfasern nicht mit imprägniert oder vielleicht abgeschnitten sind. Da die Endstrecke efferent leitender Nervenfasern morphologisch meistens gleichbedeutend mit einem sehr dünnen Durchmesser ist, sind die geschilderten Faserapparate als nervöse Endigungen unsicherer Herkunft und die Endringe als Endformationen präganglionärer Nervenfasern zu betrachten, die im Bereich der Dendriten, des Hüllgewebes und am Perikaryon lokalisiert sind. Außerdem sind unterschiedlich große Endkolben den Endapparaten präganglionärer Nervenfasern einzuordnen.

Jabonero unterscheidet im vegetativen Nervensystem 3 efferente Bahnen mit unterschiedlicher Verknüpfung: 1. neuronale Gliederung der Strecke vom cerebrospinalen Zentrum bis zu den peripheren juxtamuralen und intramuralen Ganglien; 2. syncytialer oder reticulärer Bau des vegetativen Nervensystems zwischen postganglionären Nervenfasern und nicht nervösem Erfolgsplasma; 3. ring- oder ösenförmige Endigungen postganglionärer Nervenfasern an der inneren glatten Augenmuskulatur und im Mark der Nebenniere. Der Autor grenzt in einem vegetativen Ganglion im Bereich der interneuronalen Synapse 3 Elemente voneinander ab: die Endigung der präsynaptischen Nervenfaser, die receptorische Oberfläche der Nervenzelle und das zwischen Ganglienzelle und präsynaptischer Endigung gelegene intermediäre Hüllgewebe. Nach Jabonero endigt die präsynaptische Nervenfaser im „intermediären, syncytialen Satellitenplasma". Die als Ösen, kleine Ringe oder Kolben vorliegenden

Endigungen präganglionärer Nervenfasern sollen mit dem Satellitenplasma verschmelzen und es erregen. Die Tätigkeit der Nervenzelle als Erfolgszelle wird durch einen vom Hüllgewebe produzierten Reiz ausgelöst.

Kirsche findet in sympathischen Ganglien des Menschen 4 verschiedene Synapsentypen: a) Synapsen mit kleinem Transmissionsfeld. Hierzu zählt der Autor Endringe und Endkolben. Zwischen dem von den Endringen mit nicht imprägnierbarer Neuroplasmazone gebildeten ersten Synapsenpol und dem zweiten Synapsenpol, der durch die Oberfläche der Ganglienzelle mit nicht imprägnierbarer Neuroplasmazone vertreten wird, sind keine gliösen Elemente zwischengeschaltet. b) Pericellulärapparate, zum Teil mit Endringen versehen, und Spiralapparate gehören zu den synaptischen Formationen mit großem Transmissionsfeld. Außerdem hebt der Autor noch Synapsen vom Glomerulotyp und variköse Kettensynapsen hervor.

Jabonero und Kirsche stimmen den Behauptungen Stöhrs und Reisers, die präganglionären Nervenfasern würden ein Netz entwickeln und mit den Nervenzellen irgendwie plasmatisch verknüpft sein, nicht zu, da in den peripheren Ganglien stets deutlich darstellbare Endringe und Ösen auftreten. Da umgekehrt Stöhr und Reiser die erwähnten Ringbildungen und Endkolben als Resultate ungenügender Technik oder als Reizerscheinung des Nervensystems deuten, läßt sich zwischen den *Anschauungen* der genannten Autoren keine Übereinstimmung erzielen, weil zudem Jabonero und Kirsche niemals ein nervöses Terminalreticulum im Gebiet der interneuronalen Synapse gefunden haben. Wenn man aber Stöhrs und Reisers *Befunde* mit denen von Jabonero und Kirsche und mit eigenen Resultaten vergleicht, so ergeben sich hier weitaus geringere Differenzen als zwischen den sehr abweichenden Meinungen der genannten Autoren. Auf Grund eigener Beobachtungen kann ich zu der Frage der lichtmikroskopischen Bauweise der interneuronalen Synapse folgendes feststellen: Eine synaptische Formation, sei sie in Gestalt von Ringen, Kolben oder eines Netzes vorhanden, muß sich bei Anwendung subtiler histologischer Techniken an einem bestimmten Ganglion von Mensch und Säugetier stets in nahezu gleichförmigen, immer wiederkehrenden Bau sichtbar machen lassen. Weiterhin darf als gesichert gelten, daß eine Nervenendigung nach ihrer Abtrennung von der Ganglienzelle sich für kurze Zeit nach der Durchschneidung intensiver als normalerweise imprägnieren wird und später die Zeichen einer sekundären Degeneration erkennen läßt. Beide Forderungen und Tatsachen treffen für die behauptete Existenz des nervösen Terminalreticulums in sympathischen Ganglien nicht zu. Wenn man die diesbezüglichen Ergebnisse Stöhrs und Reisers aufmerksam verfolgt, so finden sich an den abgebildeten Nervenzellen extramuraler, sympathischer Ganglien und im Nebennierenmark zahlreiche Ringe, Ösen und Kolben, während das Terminalreticulum dort meistens nicht und in Nähe intramuraler Nervenzellen nur spärlich dargestellt ist. Im letzteren Falle läßt sich nach den Abbildungen nicht entscheiden, ob das wiedergegebene Fasernetz sich wirklich der zu innervierenden Nervenzelle anlagert, mit ihr sogar verschmilzt, oder ob das nervöse Netz aus einer anderen Ebene auf die Nervenzelle skizziert wurde. Außerdem bildet Stöhr während seiner 30 Jahre währenden Arbeit am vegetativen Nervensystem nur ein einziges Mal eine netzähnliche Formation in der Umgebung einer sympathischen Nervenzelle aus dem Ganglion solare ab. Auch hier befindet sich das Nervennetz in erheblicher Entfernung vom Perikaryon, von einer Kontinuität zwischen präganglionärem Nervennetz und der Nervenzelle ist nichts zu bemerken. Da außerdem von Stöhr und Reiser eine plasmatische Verbindung präganglionärer Nervenfasern mit dem zu innervierenden Neuron (juxtamurales, sympathisches

Ganglion) nicht nachgewiesen wurde, haben die Befunde der beiden Autoren unter Berücksichtigung der angeführten Gründe jede Beweiskraft für die Existenz und angebliche Verschmelzung des Terminalreticulums mit Nervenzellen verloren.

Lediglich Hermann bildet in einer histologischen Zeichnung an einer Herzganglienzelle ein ungeheuer dichtes, fein strukturiertes und mit der Nervenzelle verschmolzenes Terminalreticulum ab, das man allerdings im Originalpräparat sehen müßte.

Die von Stöhr, Reiser und Hagen und von zahlreichen anderen Autoren (Lit. bei Kirsche 1955) beschriebenen Endkolben und Ringe werden von ihnen sowie von Szantroch (1936) und Sunder-Plassmann als Resultate ungenügender Imprägnation oder als Reizerscheinung des Nervensystems beurteilt. Die Endringe und Ösen sind danach Teile des Terminalreticulums. Dieser Meinung läßt sich schwer zustimmen, da zahlreiche Autoren (Cajal 1892—1935; Lawrentjew 1930—1934; Herzog 1931—1954; De Castro 1930—1951; Lawrentjew und Lasowsky 1931; Kolossow 1954, 1955 u.a.) mit verschiedenen histologischen Techniken synaptische Endringe und Ösen, aber kein Terminalreticulum in sympathischen Ganglien nachgewiesen haben. Botar (1956) reiht alle ring- und kolbenartigen Bildungen im Ganglion solare des Menschen pathologischen Formen ein, da er in gesunden Ganglien die erwähnten Endapparate nicht sehen konnte. Nach eigenen Beobachtungen kann ich bei Anwendung verschiedener histologischer Techniken in gesunden und veränderten Grenzstrangganglien des Menschen und von Tieren stets ring- und ösenartige Endigungen in unterschiedlicher Zahl finden. Da Stöhr lediglich die Silbertechnik nach Bielschowsky-Gros benutzt, von Ringen und Ösen am Perikaryon berichtet und andererseits ein Terminalreticulum in der von ihm definierten Gestalt und Verbindungsweise nicht dargestellt hat, macht er sich selbst den Vorwurf, unvollständige Imprägnationen durchgeführt zu haben.

Die Masse feinkalibriger, in Spiraltouren die Ganglienzellfortsätze oder das Perikaryon umhüllender Nervenfasern (Abb. 1) läßt sich als Spiralapparat bezeichnen und nach Kirsche den synaptischen Einrichtungen mit großem Transmissionsfeld einreihen. In den untersuchten menschlichen und tierischen Ganglien kamen wiederholt Spiralfasern in der in Abb. 1 wiedergegebenen Anordnung zu Gesicht. Von den Spiralapparaten sind teilweise außerordentlich faserreiche, pericelluläre Faserkörbe abzugrenzen, die vornehmlich das Perikaryon und weniger die Fortsätze umgeben. Es ist schwer entscheidbar, ob jene Faserkörbe noch als normale oder schon veränderte Bildungen anzusehen sind. Da Spiralfasern und Faserkörbe (Lawrentjew 1934) an normalen, an offensichtlich veränderten und an Ganglienzellen älterer Individuen zu beobachten sind, dürfen sie vielleicht auch als synaptische Formation aufgefaßt werden, die unter besonderen Bedingungen möglicherweise zu einem vermehrten Wachstum neigen. Während man die Spiralfasern wegen ihrer relativ häufigen Anwesenheit an normalen Ganglienzellen als Endigungsform präganglionärer Nervenfasern oder der Dendriten anderer Nervenzellen bewerten könnte, ist es schwer, über die Bedeutung der Faserkörbe zu einem Schluß zu kommen. Man kann nämlich meistens nicht feststellen, ob ein Faserkorb seine Entstehung nur präganglionären Nervenfasern, den Fortsätzen der eigenen oder anderen Nervenzellen verdankt. Es ist durchaus denkbar, daß sich alle 3 erwähnten Faserquellen zusammen oder einzeln an der Entwicklung eines Faserkorbes beteiligen und aus Spiralfasern bei weiterem

Wachstum ein Faserkorb entstehen kann. Nach Stöhr haben die Spiralfasern nichts mit synaptischen Einrichtungen zu tun. Der Autor erblickt in ihnen wie Jabonero in den Faserkörben pathologische Erscheinungen. Die von Cajal, Lawrentjew, De Castro, Abraham und Jabonero wiedergegebenen Spiralapparate hält Kirsche für normale synaptische Apparate. Obwohl über die Bedeutung der Faserkörbe und Spiralapparate sehr abweichende Meinungen bestehen, kann man in beiden Formationen den Ort der Übertragung nervöser Reize unter normalen und pathologischen Umständen sehen, auch wenn es in erkrankten Ganglien vielleicht als Folge einer Abänderung nervöser Reize zu einem vermehrten Wachstum oder überhaupt erst zu einer Entstehung der Spiralapparate und Faserkörbe gekommen ist. Wenn man jedoch bedenkt, daß Spiralfasern viel zahlreicher an normalen Nervenzellen, Faserkörbe öfter an erkrankten Ganglienzellen auftreten, so wären mit Jabonero die ersten normalen synaptischen Einrichtungen, die letzteren pathologischen Formen einzureihen. Dennoch ist auch unter obiger Voraussetzung der Ort der synaptischen Übertragung auch innerhalb der Faserkörbe zu suchen. Es bleibt weiter zu erörtern, ob man in den Spiralfasern das Ende präganglionärer Fasern oder das Endgebiet von Dendriten vor sich hat.

Als variköse Kettensynapsen werden von Kirsche dünne Nervenfasern bezeichnet, die in nahezu regelmäßigen Abständen kleine spindelförmige kompakte oder fibrilläre Verdickungen aufweisen und sich den Nervenzellen teilweise dicht anlagern. Ich habe auch im Ganglion cervicale sup. von Mensch und Katze solche Fasern beobachtet (Abb. 1, 12, 13), die ihre Anschwellungen auch an jener Strecke besitzen, die nicht mit dem Perikaryon in Berührung kommt. Die mit sehr feinen Varikositäten ausgestatteten Nervenfasern haben gelegentlich einen Endring und können mit mehreren Nervenzellen gleichzeitig Kontakte eingehen. Sollte es sich hierbei tatsächlich um synaptische Elemente handeln, so muß ähnlich wie bei Spiralfasern die Frage gestellt werden, ob eine lichtmikroskopisch sichtbare synaptische Formation stets am Ende einer Nervenfaser gelegen sein muß oder auch im Verlauf einer Nervenfaser lokalisiert sein kann. Weitere Untersuchungen müssen die Richtigkeit der erwähnten Beobachtungen zeigen, da kleine und große kompakte oder fibrilläre Anschwellungen von Nervenfasern vielfach als Kunstprodukte betrachtet werden.

In Abb. 3 erkennt man in Nähe einer sympathischen Nervenzelle aus dem Ganglion cervicale sup. des Menschen ein ringförmiges Gebilde, das sich am Ende einer wellenförmig verlaufenden Nervenfaser entwickelt hat. Der als eine synaptische Formation zu bezeichnende Endring liegt der Zelloberfläche nicht unmittelbar an, sondern erstreckt sich nur bis in das Gebiet des Hüllgewebes. Man beachte hier die deutliche präsynaptische Faserstrecke, die durch einen unregelmäßigen Verlauf und gute Imprägnierbarkeit gekennzeichnet ist. Ähnliche synaptische Figuren waren auch an anderen Nervenzellen des gleichen, unmittelbar post mortem entnommenen Ganglions zu beobachten, das keine krankhaft veränderten Nervenzellen enthielt. In Abb. 4 befindet sich ein Ring dicht am Perikaryon einer sympathischen Nervenzelle aus einem ebenfalls normalen Ganglion eines 24jährigen Mannes. Da in den gesunden Ganglien von Mensch und Tier stets isolierte oder am Ende von Nervenfasern vorhandene Ringe aufzufinden sind, liegt kein Grund vor, diese nur als pathologische Erscheinungs-

formen zu bewerten. In allen untersuchten Ganglien ließ sich kein Terminalreticulum darstellen. Daher ist es naheliegend, auch beim Menschen in den Endringen und Ösen synaptische Figuren präganglionärer Nervenfasern zu sehen, die ihre Endigungen am Perikaryon, an den Fortsätzen und im Gebiet des Hüllgewebes ausbilden.

Nach Jabonero handelt es sich nicht um eine direkte Innervation der Nervenzellen durch präganglionäre Nervenfasern. Vielmehr sollen die synaptischen Endringe mit den Hüllzellen plasmatisch verschmolzen sein. Dagegen spricht

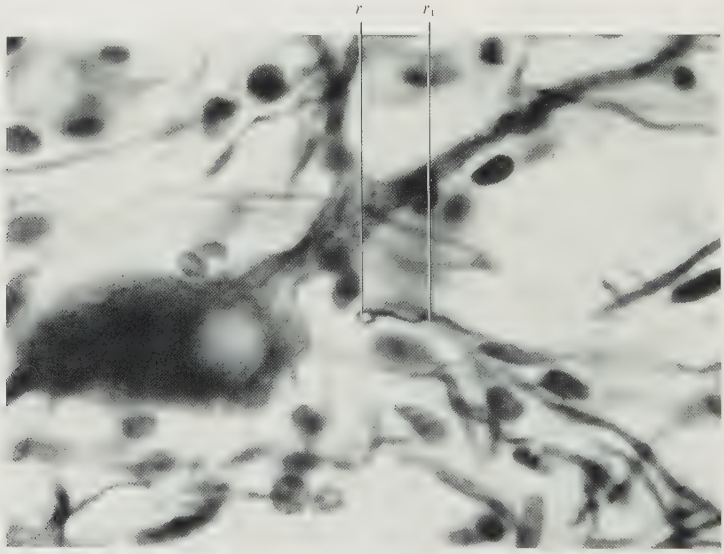

Abb. 3. Ringartige Endigung im Bereich des Hüllgewebes einer sympathischen Nervenzelle. Ganglion cervicale sup. Mensch. Bielschowsky-Feyrter-Methode. r Ringartige Endigung; r_1 präsynaptische Faserstrecke; etwa 960mal vergr., auf $^9/_{10}$ verkleinert

Kirsche von einer direkten Anlagerung der ringartigen Endigungen an das Plasma der Nervenzellen ohne Zwischenschaltung gliöser Elemente. Leider sind — nach den Abbildungen Kirsches zu schließen — in seinen Präparaten weder die Hüllzellen noch ihre Kerne imprägniert. Davon abgesehen, lassen sich aber doch folgende Lagebeziehungen der synaptischen Formation lichtmikroskopisch festlegen: 1. Unmittelbar am Perikaryon, so daß eine Berührung des Nervenzellplasmas durch das Ende der präganglionären Nervenfasern möglich ist. In diesem Fall ist jedenfalls kein Plasma der Hüllzellen zwischen Nervenzelle und Nervenendigung zu erkennen. 2. Lagerung der synaptischen Bildungen im Bereich des Hüllgewebes oder an den Fortsätzen der Nervenzellen. Hierbei vermag man keineswegs mit Sicherheit eine Verschemlzung von Synapsen mit den Hüllzellen festzustellen. Für Stöhr ist eine intranukleäre Lage von Neurofibrillen möglich, ihr Verlauf im Plasma des Hüllgewebes aber gesichert. Die Entscheidung, ob zwischen der Nervenzelle als Erfolgszelle und der synaptischen Endigung eine Plasmamasse gelagert ist und ob das Ende mancher präganglionärer Nervenfasern mit dem Plasma der Satellitenzellen kontinuierlich verbunden ist, kann nur durch elektronenmikroskopische Untersuchungen getroffen werden. Von der Lichtmikroskopie her läßt sich lediglich die Endigung präsynaptischer Nervenfasern

in Form von Ringen, Ösen und Kolben am Perikaryon, im Gebiet der Hüllzellen und an Fortsätzen der Ganglienzellen nachweisen. Von einem Kontinuum zwischen synaptischer Endigung einerseits und dem Perikaryon oder den Hüllzellen andererseits kann vorläufig nicht die Rede sein. Stöhr glaubt eine Plasmaverbindung zwischen Nervenzellen und Hüllzellen festgestellt zu haben. Der wahrscheinlich durch Schrumpfung entstandene schmale Raum zwischen manchen Ganglienzellen und ihren Kapselzellen wird teilweise von dünnen Plasmafäden des Hüllgewebes durchzogen. Die hieraus von Stöhr gezogene Folgerung, Nerven- und Hüllzellen seien plasmatisch untereinander verknüpft, ließ sich in eigenen Präparaten nicht bestätigen.

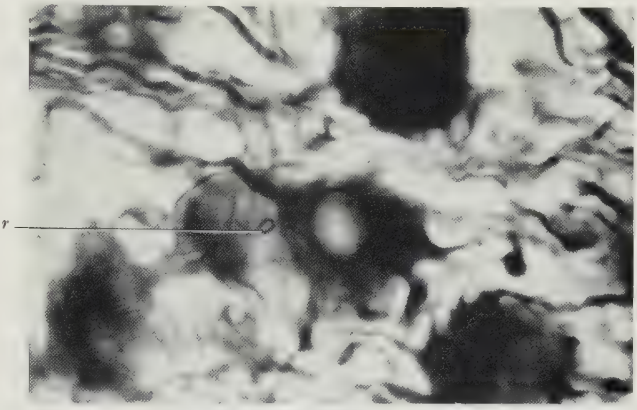

Abb. 4. Ringbildung an sympathischer Nervenzelle. Ganglion cervicale sup. Mensch. Bielschowsky-Feyrter-Methode. *r* Ringbildung; etwa 590mal vergr.

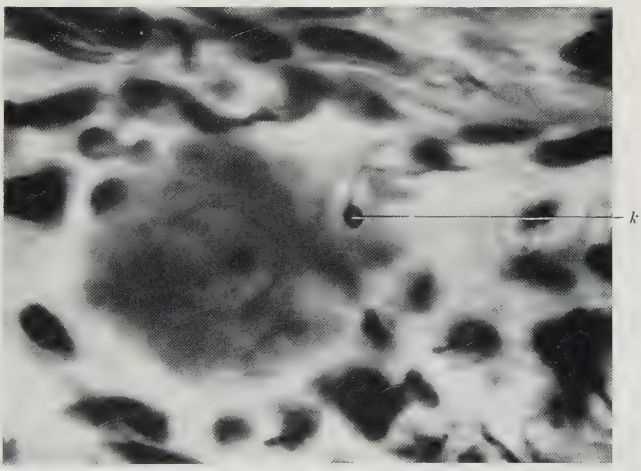

Abb. 5. Kolbenartige Endigung am Perikaryon einer sympathischen Nervenzelle. Ganglion cervicale sup. Katze. Silbercarbonat-Methode nach Jabonero. *k* Endkolben; etwa 960mal vergr.

Die präganglionären Nervenfasern lassen nicht nur Ringe und Ösen entstehen, sondern bilden auch kolbenförmige Endigungen aus, die sich ähnlich wie die Endringe und Ösen verteilen. Danach breiten sich in Nähe der Hüllzellen und an der Oberfläche der Nervenzellen nervöse Endkolben aus, die an Zahl gegenüber den ringartigen Endigungen zurücktreten. Sie sind aber zweifellos als besonderer Endigungstyp vorhanden. Die unterschiedlich großen Kolben erscheinen kompakt, andererseits jedoch fibrillär differenziert. Mitunter weisen sie eine kleine zentrale, hellere Zone auf, die von einem breiten dunkel imprägnierten Rand umgeben wird. Sehr oft liegen die kugel- oder birnförmigen Endigungen in einer Aussparung der Nervenzellen, so daß man den Eindruck erhält, als habe sich die Endigung etwas in das Plasma der Ganglienzelle eingedrückt. In diesen Fällen wird aber stets ein deutlicher, verschieden großer Spalt zwischen dem Endkolben und dem Zellplasma sichtbar. Der in Abb. 5 wiedergegebene kleine Endkolben

befindet sich in einer Bucht einer Nervenzelle aus dem Ganglion cervicale sup. (Katze). Im Vergleich mit den Nervenfasern der Endringe sind die mit Kolben ausgestatteten Fasern etwas dicker.

Da in den meisten untersuchten normalen sympathischen Ganglien (Mensch, Hund und Katze) nervöse Endkolben anzutreffen waren, kann in ihnen ebenfalls der morphologische Ausdruck einer Synapse gesehen werden. Die kolbenartigen Bildungen sollen als Endformation präganglionärer Nervenfasern gedeutet werden, obwohl man sie auch vielleicht als receptorische Organe betrachten könnte. Daneben stammen manche Nervenkolben nicht immer von Fortsätzen anderer Ganglienzellen, sondern von der gleichen Nervenzelle, an deren Oberfläche sie gelagert sind. Daher ist es oft schwierig, die Herkunft der Kolben zu bestimmen. Hierauf soll später eingegangen werden.

Kirsche beobachtete in sympathischen Ganglien des Menschen zahlreiche Endkolben unterschiedlicher Größe, welche die Oberfläche der Nervenzellen berühren[1]. Aus Jabonerос Befunden an menschlichen Sympathicusganglien geht ebenfalls die Endigungsweise von Nervenfasern in Kolbenform hervor. Stöhr vermag für die von ihm an sympathischen Nervenzellen und im Mark der Nebenniere beobachteten Endkolben keine sichere Beurteilung zu finden.

Zusammenfassend kann man nach Untersuchungen an normalen Halsganglien von Mensch, Hund und Katze feststellen: an der Oberfläche der Nervenzellen, an ihren Fortsätzen und im Bereich der Hüllzellen existieren ring-, ösen und kolbenartige Endigungen markloser Nervenfasern. Die Endapparate werden als das Ende präganglionärer Nervenfasern und als der morphologische Ausdruck von Synapsen gedeutet. Ein nervöses Netz oder eine Verschmelzung von Nervenfasern mit den Satellitenzellen oder mit Nervenzellen als Erfolgsplasma konnte nicht beobachtet werden.

Das morphologische Verhalten synaptischer Formationen nach Durchschneidung präganglionärer Nervenfasern ist von Lawrentjew und De Castro geprüft worden. Danach erstreckt sich die sekundäre Degeneration der präganglionären Nervenfasern bis zu den Pericellulärapparaten, greift aber nicht auf das mit der Synapse verknüpfte Neuron über. Nach Vereinigung der beiden Schnittenden kommt es sogar zu einer regenerativen Leistung der präganglionären Nervenfasern, indem sie sich den Nervenzellen nähern und einen Pericellulärapparat aufbauen. Unsere eigenen Durchschneidungsversuche der präganglionären Nervenstämme der oberen Halsganglien von Katzen und Hunden ergaben ebenfalls einen degenerativen Prozeß der präganglionären Nervenfasern bis zu den sympathischen Nervenzellen. Es sollen in diesem Zusammenhang nicht die in unterschiedlichen Zeitabständen ablaufenden Veränderungen der Nervenfasern beschrieben werden, da im vorliegenden Falle lediglich das Verhalten der synaptischen Strukturen nach Durchtrennung ihrer Stammfasern interessiert.

Es kann als gesichert angesehen werden, daß sich synaptische Apparate nach ihrer Abtrennung von den Mutterzellen deutlicher und intensiver imprägnieren lassen als im musterhaften Zustand. So gelang es Glees (1941—1960) u.a., schon normalerweise vorhandene, aber nur schwer und schwach imprägnierbare synaptische Gebilde an den Nervenzellen der primären Opticusganglien von Affen nach

[1] Der Autor glaubt sogar an eine Identität der elektronen- und lichtmikroskopisch nachgewiesenen Endigungen.

Durchschneidung des N. opticus sehr deutlich darzustellen. Im Tectum opticum des Huhnes und in den Opticusganglien von Kaninchen und Hunden kommen nach meinen Untersuchungen die synaptischen Figuren der Opticusfasern nach ihrer Durchtrennung besser in Silberpräparaten zum Vorschein als im Normalzustand. Als Folge einer Opticusdurchschneidung treten an retino-hypothalamischen Nervenfasern kolben- und ringförmige Endigungen auf, die sich an der Oberfläche der Nervenzellen und an Blutgefäßen des N. tuberis infundibularis (Kaninchen) erstrecken und in Normaltieren nur sehr schwer oder gar nicht zu erkennen sind. Auch im Bereich der Formatio reticularis des Hirnstammes lassen sich an der Oberfläche der Ganglienzellen synaptische Strukturen besser im geschädigten als im normalen Zustand nachweisen. Nach Läsionen oder Entfernung des Gyrus sigmoides ant. und post. bei Katzen können in einer zwar groben, aber sehr deutlichen Gestalt und Imprägnation synaptische Endringe-, Ösen und Kolben an Nervenzellen des N. ret. gigantocellularis, N. ret. paramedianus und N. ret. lat. beobachtet werden (Becher und Knoche 1961). Die Bedeutung einer Durchschneidung präganglionärer Nervenfasern für den Nachweis von Synapsen geht auch aus den Befunden Lawrentjews hervor, der auf eine Anschwellung der Ösen und erhöhte Argentophilie der präganglionären Nervenfasern nach ihrer Durchschneidung hinweist.

Bei Katzen und Hunden wurde der präganglionäre Stamm des Ganglion cerv. sup. durchtrennt, die Versuchstiere in einem Zeitraum von 12 Std bis 14 Tagen in unterschiedlichen Zeitabständen post operationem getötet. Die degenerativen Erscheinungen der präganglionären Nervenfasern drücken sich in einer gesteigerten Affinität zu Silbersalzen und in einer Fragmentation der Nervenfasern aus, die nicht alle gleichmäßig schnell degenerieren. Diese kurzen Angaben bestätigen die früheren Ergebnisse Lawrentjews, der auch auf Einzelheiten des degenerativen Vorganges eingeht. Die Entartung der präganglionären Nervenfasern erstreckt sich bis in die unmittelbare Umgebung und bis an die Oberfläche der sympathischen Nervenzellen. Ein Übergreifen des degenerativen Prozesses von präganglionären Nervenfasern auf das nächste Neuron konnte vorerst nicht beobachtet werden. Vielleicht läßt sich eine transneurale Degeneration oder Atrophie in kurzer Zeit post operationem noch nicht mit morphologischen Methoden fassen. Als noch nicht sicher zu beurteilendes Phänomen scheint sich lediglich eine schnellere und intensivere Imprägnation mancher Nervenzellen nach Durchschneidung der präganglionären Nervenfasern bemerkbar zu machen. Man erkennt die präganglionären Nervenfasern deutlich an einzelnen hintereinander gelegenen Fragmenten, an ihrer erhöhten Imprägnierbarkeit und am Auftreten ring- und kolbenförmiger Endanschwellungen. Nach Durchschneidung des präganglionären Nervenstammes werden wesentlich mehr Endkolben und Ringe als in Präparaten von Normaltieren sichtbar. Die Ringe und Kolben können am Ende degenerativ veränderter Nervenfasern liegen, treten aber ebenso zahlreich als Endigungen scheinbar intakter Nervenfasern hervor. So sind bereits frühzeitig nach Durchschneidung der präganglionären Nervenfasern (12—72 Std) etwa $^1/_2$ cm unter dem Ganglion relativ zahlreiche synaptische Apparate auszumachen, ohne daß die Faserstrecke vor dem Endring oder Kolben unbedingt Zeichen degenerativer Veränderungen aufwiese. Etwa 2—5 Tage post operationem sind synaptische Ringe und Kolben gleichzeitig an scheinbar unbeschä-

digten und fragmentierten Nervenfasern zu beobachten. Die Abb. 6 zeigt in einer Ansammlung von Nervenzellen normal aussehende und auch fragmentierte Nervenfasern sowie einige Ringe und Kolben, die sich am Ende unversehrt erscheinender und deutlich zerfallender Nervenfasern befinden (3 Tage nach Durchschneidung des präganglionären Nervenstammes, Katze). Aus der histologischen Zeichnung geht ebenfalls die gesteigerte Affinität der Ösen, Kolben und der präsynaptischen Strecke zu Silbersalzen hervor. Da die Endkolben- und Ringe ähnlich wie im Normalfall an der Oberfläche der Nervenzellen, an den Dendriten und im Bereich des Hüllgewebes zu finden sind, ist in ihnen der Endabschnitt präganglionärer Nervenfasern zu erblicken. Hieraus mag hervorgehen, daß sich kurze Zeit nach Durchtrennung des präganglionären Nervenstammes (12—96 Std) die Endigungen der präganglionären Nervenfasern im Ganglion cervicale sup. zwar in grober und vielleicht abgeänderter Form, aber doch deutlich nachweisen lassen. Wenn nach Durchschneidung der präganglionären Nervenfasern auch nicht viel über die lichtmikroskopische Feinstruktur ihrer Endigungen ausgesagt werden kann, so sind jedoch folgende Resultate zu verzeichnen:

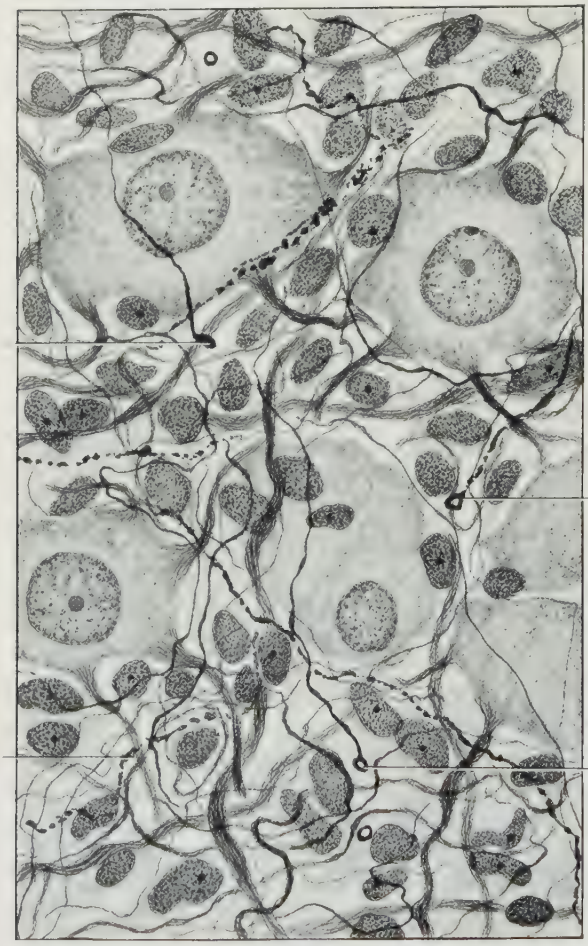

Abb. 6. Veränderte präganglionäre Nervenfasern, ring- und kolbenartige Endigungen im Ganglion cervicale sup. Katze. Durchtrennung des präganglionären Nervenstammes. Bielschowsky-Feyrter-Methode. *k* Kolbenartige Endigung; *r* ringartige Endigung; *f* fragmentierte Nervenfasern; etwa 860mal vergr.

1. Die Reaktion von normalerweise vorhandenen ring- und kolbenförmigen Endigungen auf eine Durchtrennung der präganglionären Nervenfasern deutet auf eine tatsächliche Endigung der präganglionären Nervenfasern hin. Da in einem vom präganglionären Nervenstamm abgetrennten Ganglion mehr und deutlichere Endigungen als in einem normalen Ganglion auftreten, werden sich die Endformationen der präganglionären Nervenfasern nach Durchschneidung vermutlich in einem für die Imprägnation besonders geeigneten Zustand befinden.

Daher darf man nicht von einer Vermehrung, sondern lediglich von einer *besseren Imprägnierbarkeit der Endigungen* sprechen.

2. Nach Durchschneidung des präganglionären Nervenstammes ist im Ganglion cervicale sup. kein nervöses Terminalreticulum nachweisbar. Sollte das Terminalreticulum im sympathischen Ganglion das Ende der präganglionären Nervenfasern verkörpern, so wäre immerhin mit einer Wirkung der Durchschneidung auf das nervöse Netz zu rechnen. Da sich jedoch weder in Normalpräparaten noch nach Durchschneidung der präganglionären Nervenfasern ein nervöses Terminalreticulum im Ganglion cervicale sup. darstellen ließ, bleibt das Terminalreticulum

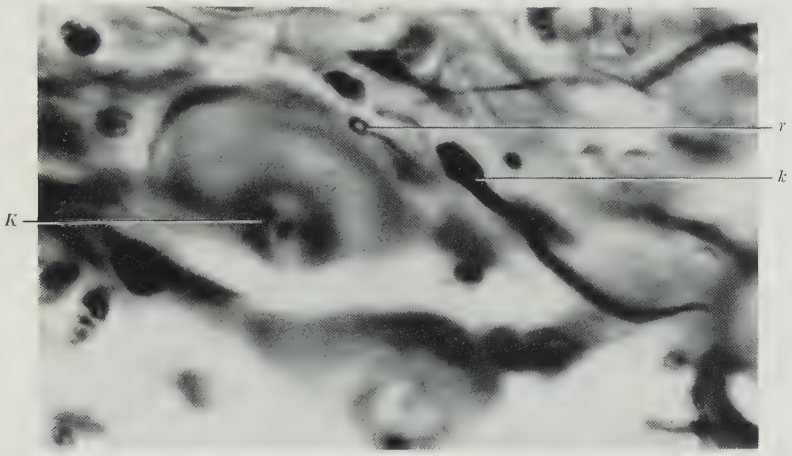

Abb. 7. Ring- und kolbenartige Endigungen an einer sympathischen Nervenzelle. Ganglion cervicale sup. Katze. Durchschneidung des präganglionären Nervenstammes. Silbercarbonat-Methode nach JABONERO. *K* Kern einer Ganglienzelle; *r* ringartige Endigung; *k* kolbenartige Endigung mit verdickter präsynaptischer Strecke; etwa 1088mal vergr.

in juxtamuralen Sympathicusganglien lediglich eine theoretische Vorstellung; von seiner realen Existenz kann vorläufig nicht die Rede sein. Dem Vorwurf, man habe seine Untersuchungen an unvollständig imprägnierten Präparaten durchgeführt, kann entgegnet werden: in zahlreichen Ganglien von Mensch und Katze trat an den Blutgefäßen das nervöse Endnetz sehr gut in Erscheinung, während in den gleichen sympathischen Ganglien an den Nervenzellen ein Terminalreticulum fehlte; dagegen sind die geschilderten Endapparate stets zu beobachten.

3. Gegen eine plasmatische Verschmelzung von präganglionären Nervenendigungen mit den Nervenzellen spricht die morphologisch faßbare Reaktion der ring- und kolbenartigen Endigungen, die keine Veränderung am Perikaryon oder an den Fortsätzen der Ganglienzellen hervorruft. Ebensowenig läßt sich umgekehrt ein besonderes Verhalten synaptischer Figuren präganglionärer Nervenfasern nach Durchtrennung postganglionärer Nervenfasern morphologisch nachweisen.

Die Befunde stimmen mit den Resultaten LAWRENTJEWs überein, der von einem Abbrechen der Degeneration des ersten Neuronensystems auf der Scheidelinie Synapse-Nervenzelle spricht und ebenfalls kein Übergreifen der Entartung präganglionärer Nervenfasern und Synapsen auf das II. Neuron beobachten konnte.

Die Veränderungen und gute Imprägnierbarkeit der synaptischen Apparate nach Durchtrennung der präganglionären Nervenfasern werden auch aus Abb. 7

und 8a u. b deutlich. In Abb. 7 erreichen zwei mit einem Ring und einer kolbenförmigen Anschwellung versehene präganglionäre Nervenfasern das Perikaryon einer Nervenzelle. Die präsynaptische Nervenstrecke ist bei der ring- wie kolbenartigen Endigung im Vergleich mit normalen Endringen und Kolben erheblich verdickt. Während der grobe Endring dem Plasma der Nervenzelle scheinbar anliegt, erreicht der verdickte Endkolben nur den Bereich der Kapselzellen. Es läßt sich naturgemäß nicht entscheiden, ob ein Nervenendkolben vor der Durchschneidung auch als Kolben vorhanden war oder ob aus dem Endring durch Anschwellung möglicherweise ein Kolben werden kann. Die teils schon normalerweise enge Anlagerung der synaptischen Endigungen an das Perikaryon wird auch nach einer Durchschneidung erkennbar. Die Abb. 8a zeigt eine seltene Form einer vielleicht veränderten synaptischen Endigung, die sich dicht an der Oberfläche des Perikaryon befindet. Das der Endigung gegenüberliegende Plasma der Nervenzelle erscheint etwas eingedellt. In Abb. 8b löst sich eine feinkalibrige Nervenfaser aus einem Nervenstrang ab, begibt sich in den Bereich der Hüllzellen einer Ganglienzelle und entwickelt dort eine verdickte präsynaptische und synaptische, ringartige Endigung.

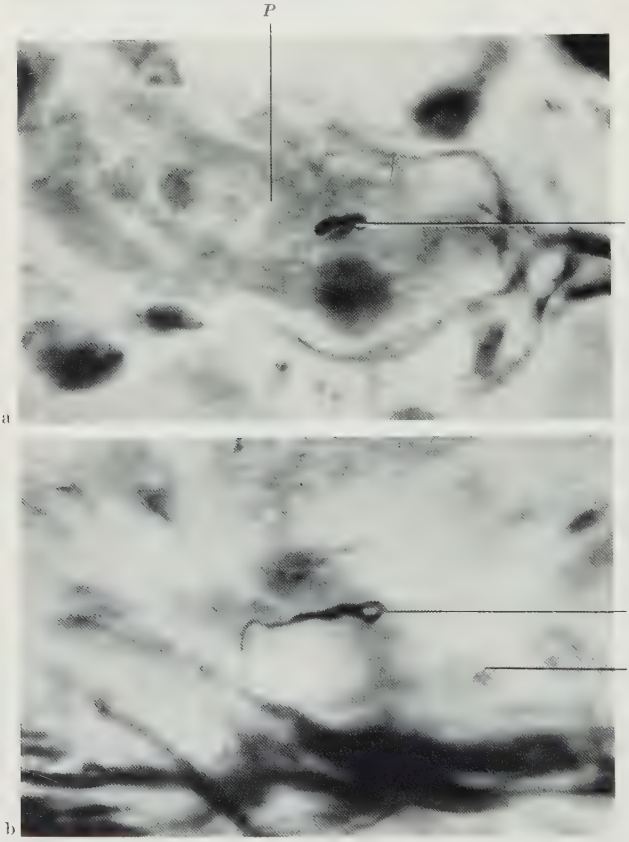

Abb. 8a u. b. Endigungen präganglionärer Nervenfasern am Perikaryon und im Bereich der Hüllzellen. Ganglion cervicale sup. Katze. Durchschneidung der präganglionären Nervenfasern. Bielschowsky-Feyrter-Methode. *P* Perikaryon; *K* Kerne der Hüllzellen; *E* Endigungen präganglionärer Nervenfasern; Abb. 8a etwa 672mal vergr., Abb. 8b etwa 1500mal vergr.

Außer der Form und der Lage der nervösen Endigungen muß auch dem morphologischen Verhalten der präterminalen Strecke Aufmerksamkeit geschenkt werden. Nach eigenen Befunden sind die präterminalen Anteile teilweise durch variköse Auflockerungen verschiedener Größe, durch einen gekrümmten, gewundenen, manchmal senkrecht abbiegenden Verlauf (Abb. 12) gekennzeichnet. Das Aussehen der präterminalen Abschnitte läßt sich mitunter mit den Fasern eines Spiralapparates vergleichen. Ähnlich verhält sich auch der präterminale Weg der zahlreichen synaptischen Endigungen an Nervenzellen des Nucleus ret. giganto-

cellularis und Nucleus ret. paramedianus. Es ist angesichts des unregelmäßigen Weges der teilweise mit kleinen kompakten oder fibrillären Knötchen und Ösen ausgestatteten präterminalen Fasern vorstellbar, daß durch die Schnittführung einmal isoliert liegende Ringe oder Kolben nur vorgetäuscht und andererseits in Übereinstimmung mit Jabonero echte Endigungen künstlich durch abgeschnittene Fasern entstehen. Trotzdem muß betont werden, daß der weitaus größte Teil der Endigungen präganglionärer Nervenfasern die Gestalt kleiner Ringe, Ösen oder Kolben zeigt. Die von Jabonero herausgestellten Unterschiede zwischen einer „leitenden Strecke" (echte Nervenfaser) und dem Gebiet, an welchem der nervöse Impuls freigesetzt wird, nämlich den präterminalen und terminalen Strukturen, lassen sich zwar nicht an jedem, aber doch an sehr vielen synaptischen Apparaten aufzeigen. Daß nach Jabonero im Bereich terminaler und präterminaler Anteile nervöse Impulse frei werden können, ist nach den morphologischen Gegebenheiten durchaus denkbar, da auch nach Durchschneidungen der präganglionären Nervenfasern nicht nur die ösen- und kolbenförmigen Endigungen, sondern meistens auch die präsynaptischen Strecken primär reagieren. Ob sich allerdings vom unterschiedlichen Bau der präterminalen Strecke auch verschiedene Funktionen ableiten lassen, ist zunächst noch fraglich. Möglicherweise sind auch die varikösen Kettensynapsen (Kirsche) der präterminalen Strecke gleichzusetzen. Ohne Zweifel läßt sich ein relativ langer Weg der präterminalen Faser im Bereich der Kapselzellen feststellen. Andererseits liegen die synaptischen Endigungen dem Nervenzellplasma so dicht an, daß von einer unmittelbaren Innervation des Neuroplasmas durch die Endigung gesprochen werden kann. Vermutlich ist eine Innervation des Neuroplasmas wie des Kapselgewebes möglich.

Nach Ansicht einiger Autoren dürfen die Endkolben (Endplättchen, Kugelphänomen) und Endringe nicht den normalen Einrichtungen des vegetativen Nervensystems eingeordnet werden, da sie vielfach an krankhaft veränderten Nervenzellen auftreten. Nun darf man meines Erachtens nicht alle in einem vegetativen Ganglion befindlichen Kolben *nur* als pathologische Bildungen oder andererseits *nur* als Endapparate präganglionärer Nervenfasern ansehen. Zunächst sind jene Kolben nicht zu berücksichtigen, die einwandfrei mit Fortsätzen der Nervenzellen in Verbindung stehen, an deren Oberfläche sie sich ausbreiten. Diese vornehmlich an erkrankten Ganglien zu erhebenden Befunde schließen die Deutung der Endkolben als Endigungen präganglionärer Nervenfasern völlig aus. Dagegen gehören zweifellos zahlreiche Endkolben und Endringe präganglionären Nervenfasern an, da die Fasern der kolben- und ringartigen Endigungen über weite Strecken im Präparat zu verfolgen sind, nicht mit den Fortsätzen von Nervenzellen des gleichen Ganglions zusammenhängen und auf eine Durchschneidung der präganglionären Nervenfasern reagieren. Nach Hermanns Untersuchungen werden die Endringe *fast* ausschließlich an degenerierter nervöser Substanz angetroffen; für die pathologische Natur der Endplättchen spreche ihr *fast* vollständiges Fehlen bei gesunden Menschen aller Lebensalter. Aus diesen Bemerkungen geht jedoch die Anwesenheit von Endringen und Kolben auch in gesunden Ganglien hervor. Wie bereits erwähnt, habe ich in allen untersuchten gesunden, erkrankten oder in den vom präganglionären Stamm abgetrennten Ganglien von Mensch und Tier stets Endringe und Kolben in unterschiedlich großer Zahl und Form gefunden, die nicht durch einen Fortsatz mit der gleichen

Ganglienzelle zusammenhängen und so nur eine präganglionäre Endigung vortäuschen könnten. Daß die geschilderten Endapparate vorwiegend bei älteren Individuen in Erscheinung treten, erklärt Herzog mit einer geringen Affinität der Endringe und Plättchen zu Silbersalzen bei Jugendlichen. Der Autor fand andererseits bei Säuglingen und Jugendlichen bis zum 15. Lebensjahr im Ganglion coeliacum eine recht ansehnliche Zahl von Endkolben und Ringen. Stöhr meint, daß jene in normalen Ganglien auftretenden Endkolben und Ringe vielleicht doch von erkrankten Nervenzellen stammen könnten. Dieser Ansicht sollte man zustimmen, wenn der Autor die Endkolben als das Ende von Neuriten erkrankter Nervenzellen und die Endkolben und Ringe als morphologischen Ausdruck eines

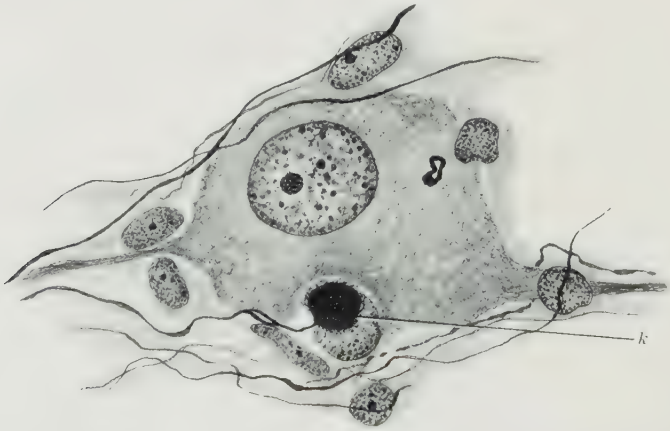

Abb. 9. Kolbenartige Endigung an einer sympathischen Nervenzelle. Ganglion cervicale sup. Katze. Durchschneidung des präganglionären Nervenstammes. Bielschowsky-Feyrter-Methode. *k* Nervöser Endkolben; etwa 1100mal vergr., auf $^{9}/_{10}$ verkleinert

Reizzustandes des Nervensystems betrachtet. De Castro hält die Endkolben für normale Bildungen am Ende präganglionärer Nervenfasern. Nach Jabonero haben die Endkolben als vergrößerte Gebilde im Normalzustand kleinerer synaptischer Formationen zu gelten.

Der in Abb. 9 wiedergegebene Endkolben liegt in einer kleinen Bucht einer Nervenzelle und zeigt an jener dem Zellplasma gegenüberliegenden Seite eine fibrilläre Differenzierung. Da ein deutlicher Spalt zwischen Nervenzelle und Endkolben sichtbar ist, kann eine lichtmikroskopisch nachweisbare Verschmelzung von Endkolben und Ganglienzelle nicht vorliegen. Außerdem befindet sich an der Oberfläche des Perikaryons ein formveränderter, stark verdickter isolierter Ring. Die auffällig starke Imprägnierbarkeit des offensichtlich vergrößerten Kolbens und Ringes ist wahrscheinlich auf die Durchschneidung des präganglionären Stammes zurückzuführen, so daß der Kolben das Ende einer präganglionären Nervenfaser verkörpert.

Obwohl im Vergleich mit Präparaten von normalen Ganglien wesentlich mehr synaptische Apparate in Ganglien, die von ihren präganglionären Stämmen abgetrennt wurden, auftraten, weist nicht jede Nervenzelle in ihrer mittelbaren oder direkten Umgebung Nervenendigungen auf. Da die präganglionären Nervenfasern nicht alle gleichmäßig schnell degenerieren, wird man damit rechnen müssen,

daß in einem erst einige Tage nach der Durchschneidung der präganglionären Fasern untersuchten Ganglion sehr wohl synaptische Figuren zu finden sind, während sich jedoch andere schon nicht mehr in einem für die Imprägnation außergewöhlichen Zustand befinden. Ebenso sind umgekehrt wenige Stunden nach der Durchtrennung die erst später sich verändernden und somit gut darstellbaren Synapsen sehr wahrscheinlich nicht zu fassen. Demnach läßt sich auch mit einer Degenerationsmethode keine sichere Angabe über die Zahl der präganglionären Nervenendigungen gewinnen. Meistens kommen an einer Ganglienzelle 1—2, selten mehr Endigungen zur Beobachtung, was aus den angeführten Gründen nichts über die tatsächliche zahlenmäßige Existenz präganglionärer Nervenendigungen aussagt. Jedenfalls kann für die Sichtbarmachung synaptischer Endringe und Kolben im Ganglion cervicale sup. die Zeit von 12—96 Std nach Durchschneidung der präganglionären Nervenfasern als günstig angegeben werden, eine Feststellung, die etwa mit den Beobachtungen von Lawrentjew, De Castro und Gibson (1937) übereinstimmt. Letzterer gibt den Zeitpunkt für die optimale Degeneration der Endösen und „Boutons" in sympathischen Ganglien zwischen dem 2. und 4. Tag an. Nach Glees ist eine Durchspülung des Versuchstieres mit der Fixierungsflüssigkeit und ein nicht allzu langes Verweilen des Materials im Fixierungsmittel für Beobachtungen einer Terminaldegeneration von Bedeutung.

Weber u. Mitarb. (1948—1958) sehen die Synapsen als unstabile Strukturen an, die cyclischen Umänderungen unterworfen sind, indem sie zugrunde gehen und ständig neu gebildet werden. Da es nicht erwiesen ist, daß synaptische Formationen lebenslängliche Strukturen verkörpern, wäre eine physiologische Abnutzung und somit ein Zugrundegehen sowie eine Neubildung von Synapsen vorstellbar. Ob die bei den angenommenen cyclischen Veränderungen auftretenden unterschiedlichen Bildungen des „metaterminalen Apparates" das morphologische Substrat verschiedener Funktionszustände aufzeigen, müssen weitere Untersuchungen klären. Die von Weber an Hand fixierter und imprägnierter Präparate aufgestellten Synapsenveränderungen lassen sich in ihrer Reihenfolge auch umgekehrt betrachten; ihre Bedeutung ist daher keineswegs geklärt. Auch die von Kirsche an menschlichem Material erhobenen Befunde über progressive und regressive Veränderungen der Endapparate sind meines Erachtens vorläufig noch nicht überzeugend.

Im Hinblick auf die klare Darstellbarkeit synaptischer Endigungen an retinohypothalamischen Nervenfasern, an Zellen der Formatio reticularis, in den primären Opticusganglien (Glees) nach Schädigung der die Endigungen tragenden Neuriten, ist es denkbar, daß auch im sympathischen Nervensystem normalerweise vorhandene, aber nur schwach oder gar nicht imprägnierbare synaptische Figuren sichtbar werden, sobald die Zelle oder der Neurit geschädigt ist. Daher liegt auch eine Veränderung, mithin eine bessere Imprägnierbarkeit synaptischer Strukturen in menschlichen Sympathicusganglien als Folge krankhafter Prozesse im Bereich der Möglichkeit. Hierbei könnten sich die morphologisch faßbaren Abänderungen der Synapsen in einer erhöhten oder vielleicht verminderten Argentophilie, in einer Vergrößerung bzw. Verkleinerung, in einer Vermehrung, vielleicht auch in einem Schwund der Endigungen ausdrücken. Jene bei Erkrankungen des vegetativen Nervensystems wirkenden Faktoren werden naturgemäß

die synaptischen Apparate in einer anderen Weise als eine Nervendurchschneidung beeinflussen. Dabei wird in erster Linie die Abgrenzung normaler von pathologischen Erscheinungsformen der Synapsen erhebliche Schwierigkeiten bereiten, zudem sicherlich auch in Krankheitsfällen de- und regenerative Leistungen des vegetativen Nervensystems an den Synapsen eine bedeutende Rolle spielen. Auch das Alter der Patienten ist bei weiteren Untersuchungen zu berücksichtigen. Außerdem haben sich künftige Forschungen der Frage zuzuwenden, ob eine Synapsenveränderung als Folge einer Erkrankung des eigenen oder zu innervierenden Neurons zu bewerten ist. Da auch Jabonero von einer leichteren Imprägnierbarkeit der Kolben und Endringe in pathologischen Fällen berichtet, darf in den gezeigten Endringen und Kolben (nach Durchschneidung des präganglionären Stammes) zwar nicht das musterhafte, aber doch ein deutliches und tatsächliches Endgebiet präganglionärer Nervenfasern gesehen werden.

Die von Jabonero, Stöhr u.a. als pathologische Bildungen gedeuteten pericellulären Faserkörbe haben nach Stöhr weder als normale noch als pathologische synaptische Apparate zu gelten. Dagegen betont Feyrter, daß die Faserkörbe das Ende der präganglionären Nervenfasern in abwegiger oder krankhaft veränderter Form enthalten. In ähnlichem Sinne sind auch die in menschlichen Sympathicusganglien umgebildeten Endringe und Kolben als Abbild normaler synaptischer Strukturen zu deuten. In Abb. 10a u. b sind aus einem Ganglion cervicale sup. (Mensch, bei Endangitis obliterans des Gehirns) eine ring- und kolbenförmige synaptische Endigung wiedergegeben, die zu dem Perikaryon der sympathischen Nervenzelle in Beziehung treten. Beim Vergleich mit solchen aus normalen Sympathicusganglien stammenden Endringen (Abb. 3) erscheint die erwähnte ringartige Endigung einschließlich ihrer präterminalen Strecke erheblich verdickt. Ähnlich wie der ebenfalls vergrößerte Endkolben der Abb. 10b hat sich auch der Endring in eine kleine Einbuchtung der Ganglienzelle vorgeschoben. Dennoch ist in beiden Fällen zwischen Perikaryon und Endigung ein deutlicher Spalt zu erkennen, der auch nicht von Fibrillen überbrückt wird. Kirsche ist nach seinen Befunden gleicher Meinung, hält aber eine Verschmelzung der Plasmen beider Neurone dennoch für möglich. Während die veränderten Endringe nur geringen Größenschwankungen unterworfen sind, können die Endkolben von der Größe eines Hüllzellkernes an bis zum halben Umfang einer Nervenzelle beobachtet werden. Nach den messenden Untersuchungen von Kirsche an menschlichen Ganglien sind die meisten Ringe kleiner als 3,5 Mikron; ihr häufigster Durchmesser liegt bei 2 Mikron. Dagegen schwankt der Durchmesser der Kolben in der Größenordnung von 4—12 Mikron. Der Autor erwähnt, daß sich das zahlenmäßige Verhältnis zwischen ring- und kolbenförmigen Endapparaten in Krankheitsfällen wesentlich ändern kann. Danach läßt sich die Diagnose: „normale oder krankhaft veränderte Synapse" nicht auf *einem* Endapparat, sondern nur auf die zahlenmäßige Verteilung der verschieden geformten Endigungen unterschiedlicher Größe gründen. Es ist schwer zu beurteilen, ob die Veränderungen der synaptischen Figuren auf die Erkrankung der Nervenzelle (als Erfolgszelle) oder auf im Seitenhorn des 1.—3. Brustsegmentes ablaufende pathologische Vorgänge zurückzuführen sind. Da die untersuchten Ganglien nur wenige erkrankte Zellen enthielten, könnte man der letzten Möglichkeit den Vorzug geben. Doch läßt sich vorläufig keine sichere Aussage darüber machen,

ob die Ursachen einer Synapsenveränderung in der Erkrankung des eigenen, des innervierten Neurons oder vielleicht beider Systeme zu suchen sind. Die auch an anderen Nervenzellen der gleichen Ganglien festgestellten Endigungen waren zum Teil über relativ weite Strecken zu verfolgen; sie können daher nicht als paraphytäre Bildungen (gestielte Kolben), sondern als Endstrecke präganglionärer Nervenfasern betrachtet werden.

Paraphytäre Kolben als Endapparate von Fortsätzen der Nervenzelle, an deren eigenen Oberfläche sie lagern, sind in erkrankten Ganglien zu erkennen und nicht mit Kolben präganglionärer Nervenfasern zu verwechseln. In Abb. 11 a erkennt man in einem erkrankten menschlichen Ganglion am Ende kurzer Fortsätze einer Ganglienzelle zwei fibrillär differenzierte Kolben (Mensch, Angina pectoris). Ob der in Abb. 11 a unten rechts sichtbare, vielfach eingekerbte Kolben einer paraphytären oder präganglionären Endigung angehört, ist kaum zu entscheiden. Dagegen läßt sich der in Abb. 11 b wiedergegebene Kolben mit ziemlicher Sicherheit als das Ende einer präganglionären Nervenfaser mit einer dickkalibrigen, ebenfalls gut imprägnierbaren präterminalen Strecke deuten, die sich in einer Ansammlung kleiner Zellen ausbreitet. Die von manchen Autoren ohne Vorbehalt durchgeführte Eingliederung typischer paraphytärer Bildungen in die Gruppe synaptischer Apparate gibt Stöhr genügend Anlaß zu heftiger Kritik und zur Einreihung aller ring- und kolbenförmigen Apparate unter die pathologischen Erscheinungsformen. Deswegen sei hervorgehoben, daß im vorliegenden Bericht nur *jene* Endkolben als synaptische Endigungen berücksichtigt wurden, deren paraphytärer Charakter nahezu sicher ausgeschlossen werden konnte. Andererseits können einwandfreie synaptische Apparate eine erhebliche Größe erreichen und möglicherweise mit Paraphyten verwechselt werden. So glaubt Reiser, in den von Horstmann (1954—1956) bei Teleostiern beobachteten synaptischen Endanschwellungen paraphytäre Apparate sehen zu müssen.

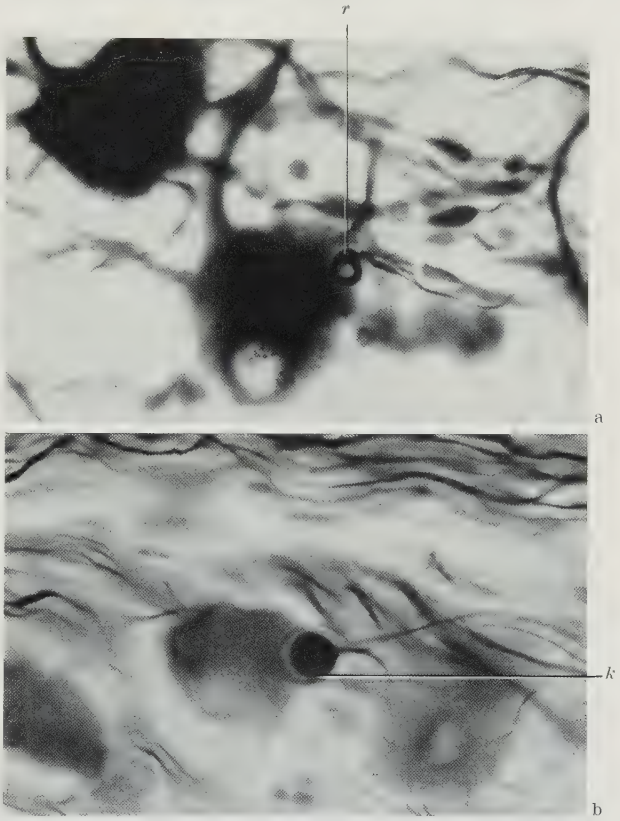

Abb. 10 a u. b. Ring- und kolbenförmige Endigungen an sympathischen Nervenzellen. Ganglion cervicale sup. Mensch. Endangitis obliterans. Bielschowsky-Feyrter-Methode. *r* Ringartige Endigung; *k* kolbenförmige Endigung; etwa 580mal vergr.

Eigene Untersuchungen an Gehirnen von Karpfen und Schleien bestätigen die Auffassung Horstmanns, nach der kernspezifische sehr große Synapsenformen im Nucleus III. vorhanden sind. Auch hier können die synaptischen Endigungen fast die Größe des innervierten Perikaryons erreichen und trotz einer oberflächlichen Ähnlichkeit mit paraphytären Gebilden deutlich als Endformation erkannt werden.

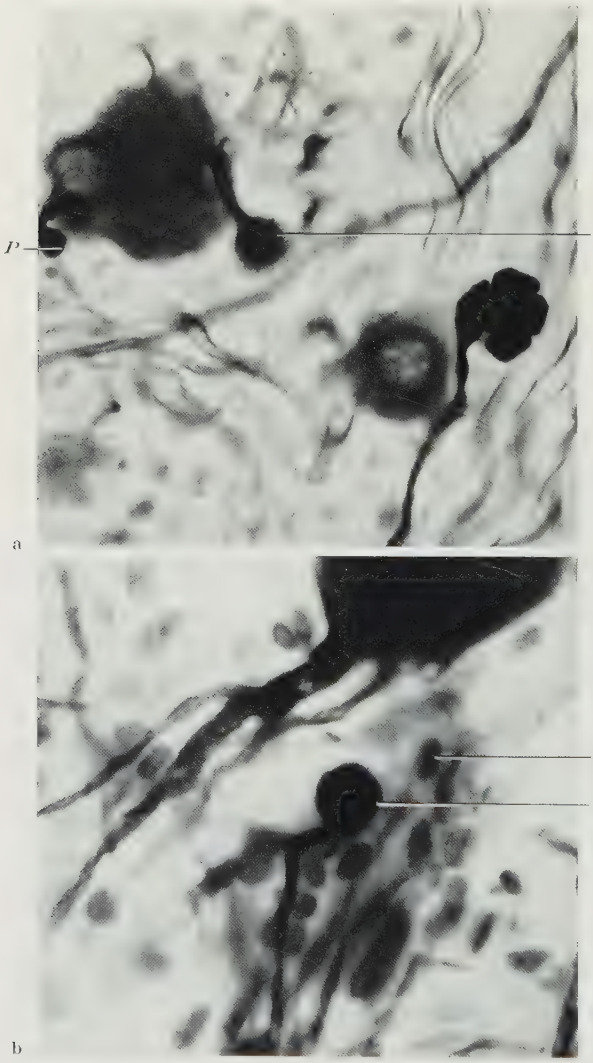

Abb. 11a u. b. Kolbenförmige Endigungen in Nähe sympathischer Nervenzellen. Ganglion cervicale sup. Mensch. Angina pectoris. Bielschowsky-Feyrter-Methode. *P* paraphytäre Kolben; *k* kolbenartige Endigung; *K* Kerne der Hüllzellen; Abb. 11a etwa 600mal, Abb. 11b etwa 880mal vergr., auf $^{9}/_{10}$ verkleinert

Stöhr und andere befinden sich teilweise im Recht, wenn sie den krankhaften Charakter von Endkolben und Ringen betonen. Diese Behauptung erfährt aber eine wesentliche Einschränkung, wenn man aus der Masse der beobachteten Kolben und Ringe diejenigen in völlig normalen Ganglien von Mensch und Tier aussondert. Abgesehen von tatsächlich paraphytären Kolben verdienen die in erkrankten Ganglien oder nach Durchschneidung des präganglionären Nervenstammes auftretenden Endringe und Kolben nicht einfach nur die Bezeichnung „pathologische Gebilde", sondern müssen auf Grund morphologisch-experimenteller Resultate eher als Abbild von Endigungen präganglionärer Nervenfasern beurteilt werden. Daher ist es erforderlich, die Anschauung Feyrters, pericelluläre Faserkörbe enthielten das Ende der präganglionären Nervenfasern, zu erweitern und auf die Endringe und Kolben zu übertragen, die das normale oder veränderte Bild synaptischer Formationen bedeuten. Somit ist in einer Verallgemeinerung festzustellen: die in normalen sympathischen Halsganglien von Mensch und Tier vorhandenen ring-, ösen- oder kolbenförmigen Apparate stellen als Ende präganglionärer Nervenfasern das morphologische Substrat einer Synapse dar. Unter abwegigen Verhältnissen (bei Erkrankungen des

vegetativen Nervensystems, vielleicht nur bei geänderter Reizung, nach Unterbrechung der präganglionären Nervenfasern) ist eine bessere Imprägnierbarkeit von weitaus zahlreicheren Endigungen zu beobachten.

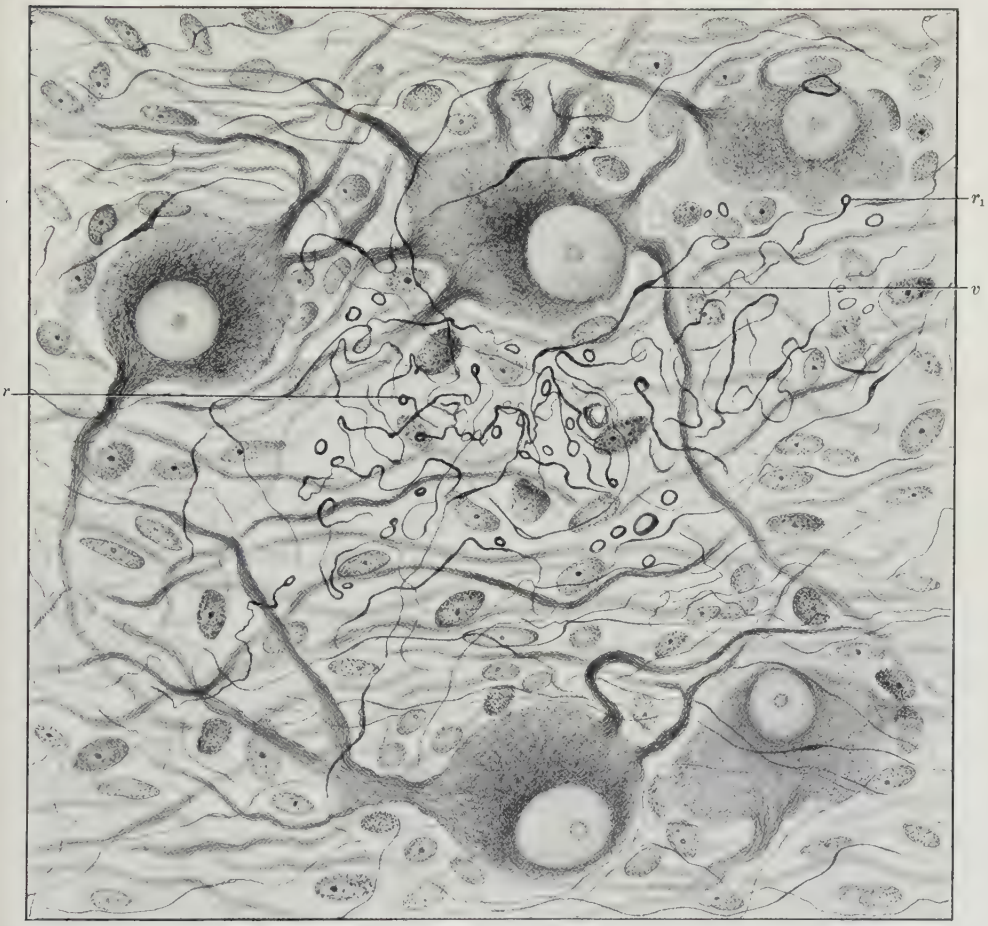

Abb. 12. Zahlreiche ringartige Endigungen zwischen und an sympathischen Nervenzellen. Ganglion cervicale sup. Mensch. Essentielle Hypertonie. Bielschowsky-Feyrter-Methode. r Ringartige Endigung; r_1 ringartige Endigung am Perikaryon; v variköse Nervenfaser; etwa 650mal vergr., auf $^4/_5$ verkleinert

Aus den geschilderten Resultaten ergibt sich nicht mit Sicherheit, ob die bessere Imprägnierbarkeit der Endringe und Kolben schon einem degenerativen Prozeß der synaptischen Formation entspricht. Obwohl einerseits die Befunde Lawrentjews (Degeneration der präganglionären Nervenfasern und erhöhte Argentophilie und Anschwellung der Ösen und Ringe) teilweise zu bestätigen und zu erweitern sind, so ist die Zahl der nach Unterbrechung des präganglionären Nervenstammes gut imprägnierbaren Endapparate doch relativ gering. Beim Vergleich mit den im zentral-nervösen System nach Schädigung des vorgeschalteten Neurons am zu innervierenden Neuron auftretenden Synapsenformen, die das Perikaryon und die Zellfortsätze in dichter Lagerung bedecken, fällt die

„Synapsenarmut" des sympathischen Nervensystems auf. Wenn man jedoch das Vorkommen synaptischer Formationen im Bereich des Hüll- und Nebengewebes sowie am Perikaryon und an den Fortsätzen der Nervenzellen berücksichtigt und außerdem annimmt, daß die synaptischen Endigungen nicht immer im Schnitt gelegen sind, so mag die sympathische „Synapsenarmut" in Übereinstimmung mit Jabonero vielleicht nur relativ sein. Man sieht den einen Neuriten einer Spinalganglienzelle schließlich auch nicht bei jeder Schnittführung. Wie aus Abb. 12 hervorgeht können die nervösen Endringe auch in menschlichen Ganglien in großer Zahl verbreitet sein. Zwischen einigen Nervenzellen eines sympathischen Halsganglions erstrecken sich in gewundenem und schlingenförmigem Verlauf feinkalibrige marklose Nervenfasern, die am Ende ring- und ösenartige Apparate aufweisen. Außerdem sieht man isolierte Ringe und Ösen sowie solche im Verlauf der Nervenfasern. Die Masse der feinkalibrigen Fasern mit ihren Endringen und isolierten ringartigen Gebilden verkörpert wahrscheinlich eine Ansammlung präsynaptischer Fasern, die sich zum großen Teil im Gebiet der Hüll- und Nebenzellen ausbreiten und mit Einzelelementen bis an das Perikaryon oder an die Fortsätze der Nervenzellen heranreichen. Vielleicht gehört die mit einigen Verdickungen und ösenförmigen Bezirken versehene Faser einer Kettensynapse nach Kirsche an, so daß nicht nur die Endigung, sondern auch der präsynaptische Weg der Faser eine synaptische Koppelung mit dem Erfolgsgewebe eingehen kann. So haben unter anderen bereits Foerster, Gagel und Sheehan (1933) behauptet, daß der an der Synapse beteiligte Abschnitt eines präsynaptischen Neurons nicht immer nur eine Axonenendigung zu sein braucht. Vielmehr kann auch ein Neurit im Vorbeiziehen mit einer synaptischen Formation einer postsynaptischen Nervenzelle angelagert sein. Auch könnte man aus obigen Befunden (Abb. 12) eine Vermehrung synaptischer Endigungen ablesen, ohne es vorerst beweisen zu können.

Nach den besprochenen Resultaten bleiben daher die Möglichkeiten einer Innervation der Hüll- und Nebenzellen sowie diejenige der Nervenzellen selbst bestehen. Nach Jabonero treten die präganglionären Nervenfasern nicht in einen unmittelbaren Kontakt mit den Nervenzellen, sondern verschmelzen mit dem Plasma der Hüllzellen, die sie innervieren. Nach eigenen Befunden ist eine Ausbreitung und Endigung der präganglionären Nervenfasern im Bereich des kleinzelligen Zwischengewebes und — in Übereinstimmung mit Kirsche — eine Anlagerung der Endringe und Kolben unmittelbar an das Perikaryon und an die Fortsätze nachweisbar. Findet man Endringe und Kolben in einiger Entfernung vom Perikaryon im Nebenzellgewebe, so ist man sich nicht immer sicher, ob tatsächlich die Neben- oder Hüllzellen innerviert werden sollen, oder ob nicht doch die Endigungen zu den Dendriten in Beziehung treten, die ja schließlich auch dort verlaufen. Eine Verschmelzung von präsynaptischen oder synaptischen Formationen mit dem Perikaryon oder Fortsätzen oder mit den Hüll- oder Nebenzellen ist lichtmikroskopisch nicht festzustellen. Ob sich zwischen eine der Oberfläche einer Nervenzelle dicht angelagerte ring- oder kolbenartige Endigung und das angeschlossene Neuron noch Plasmaanteile von Hüllzellen einschieben, ist endgültig nur aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu ersehen. Während die nervösen Endringe und Kolben stets in der beschriebenen Weise auf eine Durchtrennung reagieren, machen sich an den Elementen eines Spiralapparates keine

sicheren Anzeichen einer Veränderung bemerkbar. Eindeutige degenerative Erscheinungen ließen sich vorläufig nicht an Spiralfasern beobachten. An den von Spiralfasern umwickelten Dendriten der Nervenzellen traten lediglich vereinzelt isolierte Ringe auf. Auch die Ringe und Ösen am Ende sehr intensiv imprägnierter, offensichtlich veränderter Nervenfasern erstrecken sich zwischen den Spiralfasern, lassen sich aber nicht vorbehaltlos als degenerierte Anteile eines Spiralapparates ansehen. Sie müssen vielmehr wegen ihrer Anordnung und ihres Verlaufes den bereits beschriebenen Endigungen präganglionärer Nervenfasern zugerechnet werden. Die Abb. 13 zeigt zwischen den intakten Fasern eines Spiralapparates einzelne isolierte Ringe und mit Endringen ausgestattete degenerative Nervenfasern. Da die Spiralfasern nach einer Durchschneidung keine deutlich vom normalen Verhalten abweichenden Merkmale aufweisen, sind sie einstweilen nicht in die Reihe der präganglionären Endformationen einzugliedern. Entweder stellen sie das Ende von Dendriten dar oder die bei unseren Versuchen gewählte postoperative Zeit war zu kurz, als daß sich deutliche Veränderungen an Spiralfasern hätten entwickeln können.

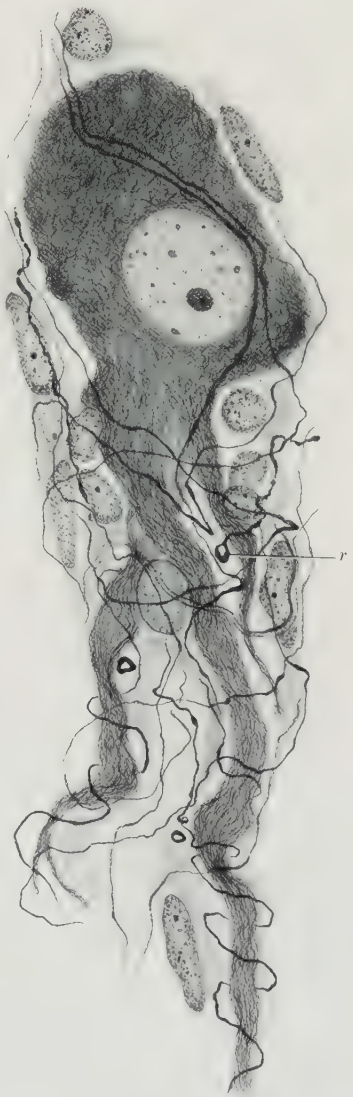

Abb. 13. Ringartige Endigung an Fortsätzen einer sympathischen Nervenzelle. Ganglion cervicale sup. Katze. Durchschneidung des präganglionären Nervenstammes. *r* Ringartige Endigung; Bielschowsky-Feyrter-Methode; etwa 1600mal vergr., auf $^4/_5$ verkleinert

Es lassen sich gegen die hier vertretenen Anschauungen einige Einwände erheben, unter anderem daß die synaptischen Endringe und Kolben lediglich pathologische Erscheinungsformen ausdrücken. Es ist mir aus der Literatur und aus eigenen Untersuchungen bekannt, daß Ringe, Ösen und Kolben in krankhaft verändertem Nervengewebe und bei experimenteller Schädigung des Nervensystems in großer Zahl auftreten. Man braucht nur einen kleinen Bezirk der zentralnervösen Substanz mechanisch zu schädigen oder mit einer spitzen Sonde in einem sympathischen Ganglion zu bohren, so bekommt man einige Zeit post laesionem die herrlichsten Ring-, Ösen- und Kolbenbildungen zu Gesicht. Sie treten unter diesen Bedingungen massenhaft im Zentralnervensystem auf. Auch die proximalen Stümpfe durchschnittener Nerven zeigen Ring- und Ösenbildungen. Man sollte nicht alle im normalen, krankhaft veränderten oder im experimentell geschädigten Nervengewebe beobachteten Ringe, Ösen und Kolben in einen Topf werfen. Derjenige, der die Ringe,

Ösen und Kolben *nur* als pathologische Erscheinungsformen betrachtet, vertritt meines Erachtens eine ebenso extreme Meinung wie jener, der in den genannten Formationen *nur* normale Synapsen sieht. An der Richtigkeit der Beobachtungen ist keineswegs zu zweifeln. Die von so vielen Autoren im normalen zentralen und vegetativen Nervensystem nachgewiesenen Endringe, Kolben und Ösen stellen wahrscheinlich das morphologische Substrat von Synapsen dar. Andererseits kann die Anwesenheit von Ringen, Ösen und Kolben im erkrankten oder experimentell geschädigten Nervengewebe nicht bestritten werden. Diese beiden Tatsachen sollte man künftig auseinanderhalten. Zudem ließ sich, wie bereits erwähnt, das häufige Auftreten der Ringe, Ösen und Kolben im pathologisch veränderten Nervensystem mit unseren experimentellen Resultaten in Einklang bringen; man kann nämlich feststellen, daß auch im erkrankten Nervensystem zahlreiche synaptische Ringe und Ösen für die Imprägnation, möglicherweise im abwegigen Zustand, besser als normalerweise geeignet erscheinen. Warum sollten die nach Durchschneidung am proximalen Nervenende auftauchenden Ringe und Kolben nicht wieder einer Synapse entsprechen, indem die Nervenzelle an dem neuen, tatsächlichen Ende ihres Neuriten eine dem ursprünglichen Normalbild ähnliche oder abgeänderte synaptische Struktur entwickelt. Diese Anschauung ist auch im Hinblick auf die im erkrankten oder experimentell geschädigten Nervengewebe am Ort der Läsion sichtbaren Ringe, Ösen und Kolben vertretbar. Auch könnten zahlreiche, für lichtmikroskopische Untersuchungen nicht oder schlecht faßbare axodendritische oder axonale Synapsen auftauchen. Zur Klärung dieser Fragen bedarf es jedoch umfangreicher Untersuchungen. Jedenfalls kann man auf Grund der geschilderten lichtmikroskopischen Untersuchungen abschließend sagen: da in normalen sympathischen Grenzstrangganglien von Mensch und Säugetieren ein nervöses Terminalreticulum (Stöhr, Reiser) und ein periterminales Netzwerk (Boeke) nicht darzustellen sind, dafür aber ring-, ösen- und kolbenartige Endigungen nachgewiesen werden können, müssen diese als das morphologische Substrat einer Synapse bewertet werden. Die Endigungen lagern im Bereich der Hüll- und Nebenzellen, an den Nervenzellfortsätzen und am Perikaryon selbst. Nach Durchschneidung des präganglionären Nervenstammes erweisen sich die synaptischen Formationen eine Zeit lang für eine Imprägnation besser geeignet als im Normalzustand.

Zusammenfassung

Nach Untersuchungen zahlreicher oberer sympathischer Halsganglien von Mensch und Tier läßt sich der Bau der interneuronalen Synapse folgendermaßen darstellen: am Perikaryon, an den Fortsätzen der sympathischen Nervenzellen und im Bereich der Hüllzellen wurden ring- und kolbenartige Endigungen beobachtet. Auf Durchschneidung des präganglionären Nervenstammes reagieren die erwähnten Endringe mit einer Vergrößerung und gesteigerten Affinität der Endringe und Kolben zu Silbersalzen. Daher sind die ring- und kolbenförmigen Endapparate als das Ende präganglionärer Nervenfasern zu betrachten.

Die von zahlreichen Autoren und mir in sympathischen Ganglien des Menschen nachgewiesenen Endkolben und Endringe sind ebenfalls als Synapsen anzusehen. Ihr häufiges Auftreten in erkrankten Ganglien wird auf eine durch einen Reizzustand hervorgerufene erhöhte Argentophilie zurückgeführt.

Literatur

Ábrahám, A.: Die Struktur des Ganglion coeliacum beim Menschen. Allaz Közlem **37**, 154—163 (1940).

— The comparative histology of the stellate ganglion. Acta biol. Acad. Sci. hung. **2**, 311—354 (1951).

Baron, H.: Statistische Untersuchungen an Nervenzellen menschlicher, sympathischer Ganglien. Z. mikr.-anat. Forsch. **30**, 613—644 (1932).

Becher, H., u. H. Knoche: Zur Frage der Kenntnis der Formatio reticularis. Dtsch. Z. Nervenheilk. (im Druck).

Bielschowsky, M.: Allgemeine Histologie und Histopathologie des Nervensystems. In Bumke-Foersters Handbuch. Berlin: Springer 1935.

Boeke, J.: Innervationsstudien. I. u. II. Z. mikr.-anat. Forsch. **33**, 23—90 (1933).

— Die periphere Endausbreitung des sympathischen Systems. Nova Acta Leopold., N. F. **2**, 210—257 (1935).

— Über die Verbindung der Nervenzellen untereinander und mit den Erfolgsorganen. Anat. Anz. **85**, Erg.-H., 111—141 (1938).

— The sympathetic endformation, its synaptology, the interstitial cells, the periterminal network and its bearing on the neurone theory. Discussion and critique. Acta anat. (Basel) **8**, 18—61 (1949).

— Sympathischer Grundplexus contra Terminalreticulum. Acta neuroveg. (Wien) **2**, 32—40 (1951).

Botár, I.: Einteilung und Struktur-Eigenschaften der Ganglien des vegetativen Nervensystems. Szeged 1934.

— Qualitative und quantitative Untersuchung der Nervenzellen des Ganglion coeliacum im Alter. Acta anat. (Basel) **28**, 157—206 (1956).

Cajal, R.: Die Neuronenlehre. In Handbuch der Neurologie, Bd. 1, S. 887—994. 1935.

Castro, F. de: Sympathetic ganglia in Penfield: Cytology and cellular pathology of the nervous system, vol. I. New York: P. B. Hoeber 1932.

— Die normale Histologie des peripheren, vegetativen Nervensystems. Das Synapsenproblem: Anatomisch-experimentelle Untersuchungen. Verh. Dtsch. Ges. Path., 34. Tagg, S. 1—52, 1950.

Cole, E. C.: Anastomosing neurons in the myenteric plexus of the human sigmoid flexure. J. comp. Neurol. **51**, 209—215 (1930).

Dogiel, A. S.: Zur Frage über den feinen Bau des sympathischen Nervensystems bei den Säugetieren. Arch. mikr. Anat. **46**, 305—344 (1895).

— Zwei Arten sympathischer Nervenzellen. Anat. Anz. **11**, 679—687 (1896).

Feyrter, F.: Über die Pathologie der vegetativen nervösen Peripherie und ihrer ganglionären Regulationsstätten. Wien: Wilhelm Maudrich 1951.

Foerster, O., O. Gagel u. D. Sheehan: Veränderungen an den Endösen im Rückenmark des Affen nach Hinterwurzeldurchschneidung. Z. Anat. Entwickl.-Gesch. **101**, 553—565 (1933).

Gibson, W. C.: Degeneration of the boutons terminaux in the spinal cord. Arch. Neurol. Psychol. **38**, 1145—1157 (1937).

Glees, P.: Neuroplasmatische Verbindungen zwischen Zellen des mesencephalen Trigeminuskernes bei Scyllium canicula. Proc. kon. ned. Akad. Wet. **41**, 426—430 (1938).

Greving, R.: Makroskopische Anatomie und Histologie des vegetativen Nervensystems. In Handbuch der Neurologie, Bd. 1, S. 811—886. Berlin: Springer 1935.

Harting, K.: Beobachtungen an sympathischen Ganglienzellen des Kaninchens. Z. Zellforsch. **28**, 457—484 (1938).

— Über die feinere Innervation der extrahepathischen Gallenwege. Z. Zellforsch. **12**, 518 bis 543 (1931).

Hermann, H.: Die Herzganglien des Kindes und ihre Veränderungen beim Tetanus. Dtsch. Z. Nervenheilk. **159**, 359—375 (1948).

— Mikroskopische Beobachtungen an den Herzganglien des Menschen bei Coronarsklerose. Virchows Arch. path. Anat. **316**, 341—372 (1949).

— Mikroskopische Studien an menschlichen Herzganglien. Z. Anat. Entwickl.-Gesch. **114**, 511—524 (1950).

Hermann, H.: Mikroskopische Beobachtungen über Altersveränderungen an menschlichen Herzganglien. Z. Anat. Entwickl.-Gesch. **114**, 685—719 (1950).
— Pathologische Histologie des peripheren vegetativen Nervensystems. Berlin: Medizinische Verlagsanstalt 1955.
Herzog, E.: Erkrankungen des vegetativen Nervensystems. In Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie, Bd. 13, Teil 5. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955.
— Die Pathologie der peripheren, vegetativen Ganglien. Verh. Dtsch. Ges. Path. **34**, 52—86 (1951).
— Über die periphere Glia in den sympathischen Ganglien. Z. Zellforsch. **40**, 199—206 (1954).
—, u. B. Günther: Beitrag zum Problem der Synapsen und der Scheidenzellen in den sympathischen Ganglien. Z. Zellforsch. **31**, 461—490 (1941).
Hild, W.: Vergleichende Untersuchungen über Neurosekretion im Zwischenhirn von Amphibien und Reptilien. Z. Anat. Entwickl.-Gesch. **115**, 459—479 (1951).
— Zur Frage der Neurosekretion im Zwischenhirn der Schleie (Tinca vulgaris) und ihrer Beziehungen zur Neurohypophyse. Z. Zellforsch. **35**, 33—46 (1951).
— Über Neurosekretion im Zwischenhirn des Menschen. Z. Zellforsch. **37**, 301—316 (1952).
Hillarp, N. A.: Structure of the synapse and the peripheral innervation apparatus of the autonomic nervous system. Acta anat. (Basel) **2**, Suppl. 4, 1—153 (1946).
Horstmann, E.: Über besondere Synapsenverhältnisse im ZNS von Knochenfischen (Gadiden). Verh. anat. Ges. (Jena) **100**, Erg.-H., 213—219 (1953).
— Über kernspezifische Synapsenformen im Mittelhirn von Knochenfischen. Z. Zellforsch. **40**, 139—150 (1954).
— Familien- und kernspezifische Synapsenformen bei Teleostiern. Progress in neurobiology, S. 26—33. Amsterdam: Elsevier Publ. Comp. 1956.
— Ergebnisse und Probleme der Morphologie interneuronaler Synapsen. Dtsch. med. Wschr. **82**, 731—735 (1957).
Jabonero, V.: Der anatomische Aufbau des peripheren, neurovegetativen Systems. Acta neuroveg. (Wien) Suppl. **4**, 1—159 (1953).
— Die anatomischen Grundlagen der peripheren Neurosekretion. Acta neuroveg. (Wien) Suppl. **6**, 160—302 (1955).
— Études sur les synapses du système neurovégétatif périphérique. I. Les synapses dans les ganglions sympathiques humains. Z. mikr.-anat. Forsch. **61**, 360—419 (1955).
Kirsche, W.: Synaptische Formationen im Ganglion stellare des Menschen. Z. mikr.-anat. Forsch. **60**, 399—466 (1954).
— Zur Frage funktionell bedingter Veränderungen der synaptischen Formation. Psychiat. Neurol. med. Psychol. (Lpz.) **6**, H. 5, 125—128.
— Messungen an ring- und kugelförmigen Endapparaten im Ganglion stellare des Menschen. Z. mikr.-anat. Forsch. **61**, 541—548 (1955).
— Synaptische Endigungen im Ganglion coeliacum des Menschen. Z. mikr.-anat. Forsch. **61**, 624—640 (1955).
— Die Neuronentheorie. Münch. med. Wschr. Jahrg. **102**, 2266—2274 (1960).
Knoche, H.: Über die feinere Innervation der Niere des Menschen. I. Z. Anat. **115**, 97—114 (1950).
— Über die feinere Innervation der Niere des Menschen. II. Z. Zellforsch. **36**, 448—475 (1951).
— Über die feinere Innervation der Art. uterina des Menschen. Z. Zellforsch. **37**, 205—239 (1952).
— Zum Problem der intercalären Zellen. Acta neuroveg. (Wien) **4**, 177—178 (1952).
— Über das Vorkommen eigenartiger Nervenfasern (Nodulus-Fasern) in Hypophyse und Zwischenhirn von Hund und Mensch. Acta anat. (Basel) **18**, 208—223 (1953).
— Untersuchungen über die Endigungsweise cerebrospinaler und vegetativer Nervenfasern. Z. Zellforsch. **40**, 162—198 (1954).
— Degenerative Veränderungen des vegetativen Nervensystems in der Glatzenhaut. Arch. Derm. Syph. (Berl.) **197**, 505—512 (1954).
Zur feineren Innervation des Thymus vom Menschen. Z. Zellforsch. **41**, 556—593 (1955).
— Untersuchungen über die nervöse Versorgung der Eizelle. Acta neuroveg. (Wien) **10**, 502—512 (1955).

Knoche, H.: Beitrag zum Bau der neurovegetativen Endformation. Z. mikr.-anat. Forsch. **64**, 110—118 (1958).
Kölliker, A.: Die Selbständigkeit und Abhängigkeit des sympathischen Nervensystems. Zürich 1844.
— Zur feineren Anatomie des zentralen Nervensystems. Z. wiss. Zool. **49**, 663—689 (1890).
Kolossow, N. G., u. I. F. Iwanow: Zur Frage der Innervation des Verdauungsaktes einiger Fische. Z. mikr.-anat. Forsch. **22**, 533—556 (1930).
—, u. G. H. Sabussow: Die sympathische Innervation des Verdauungsaktes der Sumpfschildkröte. Z. mikr.-anat. Forsch. **15**, 157—190 (1928).
— — Beiträge zum Studium der sympathischen und spinalen Ganglien einiger Reptilien und Vögel. Z. mikr.-anat. Forsch. **18**, 5—36 (1929).
Landau, E.: Peut on parler d'une innervation végétative de la cellule nerveuse? Vjschr. naturforsch. Ges. Zürich **91**, 253—261 (1946).
— Neuere Ergebnisse der Neurohistologie. Ergebn. med. Grundlagenforsch. **1**, 587—598 (1956).
Lawrentjew, B. I.: Über die Erscheinungen der Degeneration und Regeneration im sympathischen Nervensystem. Z. mikr.-anat. Forsch. **2**, 201—223 (1925).
— Experimentell-morphologische Studien über den feineren Bau des autonomen Nervensystems. I. Die Beteiligung des Vagus an der Herz-Innervation. Z. mikr.-anat. Forsch. **16**, 383—411 (1929).
— Experimentell-morphologische Studien über den feineren Bau des autonomen Nervensystems. Z. mikr.-anat. Forsch. **18**, 232—262 (1929).
— Zur Lehre von der Cytoarchitektonik des peripheren autonomen Nervensystems. I. Z. mikr.-anat. Forsch. **23**, 527—551 (1931).
— Experimentell-morphologische Studien über den feineren Bau des autonomen Nervensystems. IV. Z. mikr.-anat. Forsch. **35**, 71—118 (1934).
— Einige Bemerkungen über Fortschritte und Aufgaben der Erforschung des autonomen Nervensystems. Z. mikr.-anat. Forsch. **36**, 651—659 (1934).
—, u. I. M. Lasowsky: Über die Reizerscheinungen im autonomen Nervensystem. Die Natur des sogenannten „Kugelphänomens". Z. ges. Neurol. Psychiat. **131**, 585—601 (1931).
Meijling, H. A.: Das periphere Nervennetz und sein Zusammenhang mit den ortho- und parasympathischen Nervenfasern. Acta neuroveg. (Wien) Suppl. **6**, 35—63 (1955).
Mitchell, G. A. G.: Anatomy of the autonomic nervous system. London E. & S. Livingstone 1953.
Müller, E.: Über das Darmnervensystem. Upsala Läk.-Fören. Handl. N. F. **26**, 1—22 (1921).
Müller, L. R.: Lebensnerven und Lebenstriebe. Berlin: Springer 1931.
Ottaviani, G.: Osservationi, istoanatomiche e sperimentali sulla innervazione dell'esofago di alcuni mammiferi. Z. Zellforsch. **27**, 393—492 (1938).
— Histologisch-anatomische Untersuchungen über die Innervation des Mastdarms. Z. mikr.-anat. Forrch. **47**, 151—182 (1940).
— Osservazioni sulle cellule interstiziali de Cajal. Arch. ital. Anat. Embriol. **43**, 75—89 (1940).
Pines, L., u. K. Narowtschatowa: Über die Morphologie des Ganglion oticum. Z. Zellforsch. **20**, 764—778 (1934).
Reiser, K. A.: Der Nervenapparat im Processus vermiformis nebst einigen Bemerkungen über seine Veränderungen bei chronischer Appendicitis. Z. Zellforsch. **15**, 761—800 (1932).
— Über die Endausbreitung des vegetativen Nervensystems. Z. Zellforsch. **17**, 610—641 (1933).
— Über die Nerven der Darmmuskulatur. Z. Zellforsch. **22**, 675—693 (1935).
— Über die Innervation der Hornhaut des Auges. Arch. Augenheilk. **109**, 251—280 (1936).
— Über die Innervation der menschlichen Sklera. Arch. Augenheilk. **109**, 481—496 (1936). Veränderungen am Hornhautnervenapparat des Kaninchens nach Exstirpation des Ganglion Gasseri. Heidelberger Ber. **51**, 287—292 (1936).
— Die Neuronenlehre im Lichte neuerer histologischer Forschung. Dtsch. med. Wschr. **1938**, 487.
— Zur Lehre vom Feinbau der nervösen Substanz. Z. ges. Neurol. Psychiat. **175**, 485—651 (1943).

Reiser, K. A.: Die Entwicklung unserer Anschauung über das Nervensystem. Klin. Mbl. Augenheilk. **110**, 600—605 (1944).
— Bemerkungen zum Feinbau der vegetativ-nervösen Peripherie. Acta neuroveg. (Wien) **4**, 179—187 (1952).
— Das Verhalten der Hornhautnerven bei der Transplantation. Heidelberger Ber. **59**, 241—245 (1955).
— Mikroskopische Anatomie des Nervensystems. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1959.
Rieder, W.: Histologische Studien an autonomen Ganglienzellen nach peripherer Entnervung. Langenbecks Arch. klin. Chir. **167**, 327—331 (1931).
— Mikroskopische Untersuchungen des intramuralen Plexus bei chirurgischen Erkrankungen des Magens. Dtsch. Z. Chir. **244**, 471—490 (1935).
Sabussow, G. H., u. A. F. Ssuslikow: Experimentell-morphologische Analyse der autonomen Innervation der Gallenblase der Säugetiere. Z. Anat. Entwickl.-Gesch. **106**, 739—748 (1937).
Schabadasch, A.: Studien zur Architektonik des vegetativen Nervensystems. Z. Zellforsch. **21**, 657—732 (1934).
Schimert, J.: Die Nervenversorgung des Myokards. Z. Zellforsch. **27**, 246—266 (1937).
— Die „syncytielle Natur" des vegetativen Nervensystems. Z. mikr.-anat. Forsch. **44**, 85—118 (1938).
Seto, H.: Über zwischen Aorta und Arteria pulmonalis gelegene Herzparaganglien. Z. Zellforsch. **22**, 213—231 (1935).
— Mikroskopische Studien zur Innervation des menschlichen Herzens. Arb. anat. Inst. Sendai **19**, 1—47 (1936).
— Über die afferenten Nerven im Aortenbogen und im Herzen beim Menschen im Hinblick auf den Aorten- und Herzreflex. Arb. anat. Inst. Sendai **20**, 1—16 (1937).
— Über die intraepithelialen Nerven beim Menschen. I. Arb. anat. Inst. Sendai **22**, 1—25 (1939).
—, u. U. Fukuyama: Zur Innervation der Speicheldrüsen des Igels. J. orient. Med. **25**, 177—196 (1936).
Spanner, R.: Der Bauchsympathicus der Blindschleiche und seine Beziehungen zur Innervation der Niere. Z. Zellforsch. **8**, 740—764 (1939).
Spatz, H.: Neuronenlehre und Zellenlehre. München: J. F. Lehmann (1952).
Stöhr jr., Ph.: Die peripheren Anteile des vegetativen Nervensystems. In Handbuch der mikroskopischen Anatomie, Bd. IV/1, S. 265—447. Berlin: Springer 1928.
– Mikroskopische Studien zur Innervation des Magen-Darm-Kanales. II. Über die Nerven des menschlichen Magens und ihre Veränderungen beim Ulcus. Z. Zellforsch. **16**, 123—197 (1932).
— Beobachtungen über Nerven des menschlichen Magens und ihre Veränderung beim Ulcus chronicum. Klin. Wschr. **1932 II**, 1214—1215.
— Über „Nebenzellen" und deren Innervation in Ganglien des vegetativen Nervensystems, zugleich ein Beitrag zur Frage der Synapsen. Z. Zellforsch. **29**, 569—612 (1939).
— Zusammenfassende Ergebnisse über die normale und pathologische Histologie der sympathischen Ganglienzelle und der Endapparate im vegetativen Nervensystem. Ergebn. Anat. Entwickl.-Gesch. **33**, 135—284 (1941).
— Studien zur normalen und pathologischen Histologie vegetativer Ganglienzellen. I. Z. Zellforsch. **32**, 587—635 (1943).
— Über pathologisch-anatomische Veränderungen am Halsgrenzstrang bei Bronchialasthma. Allg. path. Schriftenreihe **1943**, H. 3/4, 1—14.
— Mikroskopische Studien zur Innervation des Magen-Darmkanales. V. Z. Zellforsch. **34**, 1—54 (1947).
— Lehrbuch der Histologie. Heidelberg-Berlin-Göttingen: Springer 1951.
— Mikroskopische Anatomie des Nervensystems. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1957.
Sunder-Plassmann, P.: Sympathicuschirurgie. Stuttgart: Georg Thieme 1953.
Suzuki, N.: On the lobus electricus and the nervi electrici of narke japonica. J. orient. Med. **25**, 1—12 (1936).

Szantroch, Z.: Beobachtungen an den Kulturen des Sympathicus. Arch. exp. Zellforsch. **14**, 442—452 (1933).
— Kritisch-methodologische und entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen über die Mikrostruktur des sympathischen Grenzstranges und Versuch zu deren Deutung auf morphologischer Grundlage. Z. Zellforsch. **23**, 464—494 (1936).
Weber, A.: L'appareil métaterminal prolongement des fibres nerveuses. C. R. Soc. Biol. (Paris) **137**, 422 (1943).
— Quelques aspects des terminaisons nerveuses. C. R. Ass. Anat. **34**, 476 (1947)
— La structure de certaines terminaisons nerveuses montre des variations cycliques. Experentia (Basel) **4**, 394—395 (1948).
— Instabilité des synapses sur le parcours des voies nerveuses. Bull. Acad. Méd. (Paris) **133**, 605—606 (1949).
— Instabilité de l'appareil métaterminal. C. R. Ass. Anat. **36**, 732 (1949).
— Régéneration des terminaisons nerveuses à la suite de leur dégénérescence physiologique chez les mammifères. Bull. Histol. appl. **27**, 163—168 (1950).
— Instabilité des terminaisons nerveuses dans les synapses intracellulaires du système végétatif. C.R. Soc. Biol. (Paris) **146**, 813—814 (1952).
— Les terminaisons des fibres préganglionaires sur les cellules nerveuses du système végétatif. C. R. Soc. Biol. (Paris) **146**, 883—885 (1952).
— Modifications pathologiques de l'appareil métaterminal dans les fibres nerveuses chez l'homme. Gaz. méd. port. **7**, 201—204 (1954).

Privatdozent Dr. Hermann Knoche, Anatomisches Institut der Universität Münster (Westf.), Vesaliusweg 2—4

Zeitschrift für Zellforschung 54, 238—251 (1961)

Aus dem Max Planck-Institut für Biologie, Abt. Beermann, Tübingen

INTERZELLULÄRE BRÜCKEN (FUSOME) IM HODEN UND IM EI-NÄHRZELLVERBAND VON *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Von

Günther F. Meyer

Mit 11 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. Februar 1961)

1. Einleitung

In einer vor kurzem erschienenen Untersuchung von Fawcett u. Mitarb. (1959) werden in verschiedenen Geweben, die eine gemeinsame und synchrone Entwicklung durchmachen, interzelluläre Brücken beschrieben. Im Gegensatz zu anderen interzellulären Verbindungen, z. B. den Desmosomen in Mesothel, Epidermis und im Herzmuskel (Selby 1955, Porter 1956, Odland 1958, Horstmann und Knoop 1958, Hama 1960, Karrer 1960, Grimley 1960 u. a.) und den Plasmodesmen in Pflanzenzellen (Strugger 1957), kommen diese Brücken durch eine einzelne, große, ringförmige Öffnung zustande. Ihr Rand ist in besonderer Weise differenziert, und die elektronenmikroskopischen Bilder sprechen dafür, daß diese Brücken tatsächlich den freien Durchtritt von cytoplasmatischem Material einschließlich Mitochondrien gestatten. Nach den Untersuchungen von Fawcett am Hoden verschiedener Tiere und an den Cnidoblasten von *Hydra* entstehen die interzellulären Brücken als Folge von unvollkommenen Zellteilungen, da bei der Plasmateilung die Ringfurche den Spindelrestkörper nicht durchtrennt. Nach Auflösung des Spindelrestkörpers bleibt die Öffnung bestehen, so daß eine vollkommene, plasmatische Kontinuität zwischen den Tochterzellen hergestellt ist. Diese Befunde von Fawcett u. Mitarb. decken sich mit den Beobachtungen von Hirschler (1935, 1948, 1953), der außerdem die Ursache für die räumliche Ordnung im Ei-Nährzellverband der Insektenovarien in der Ausrichtung der „Zellkoppeln" auf die Centrofusome („Zentralspindeln") sieht.

Fusomähnliche Strukturen in Ovarien wurden von Bauer (1953) beschrieben, der sie als Zellkoppelringe bezeichnet und mit einer Reihe von Mikrophotographien belegt. Nach A. Miller (in Demerec 1950) kommen bei *Drosophila* interzelluläre Brücken vor, die Ei- und Nährzellen miteinander verbinden. Auch King (1960) schreibt von Verbindungen in Form großer „Poren" zwischen den einzelnen Zellen eines Nährzellverbandes. Außerdem spricht er von interzellulären Brücken zwischen der Eizelle und den ihr anliegenden Nährzellen, vermeidet aber eine Identifizierung beider Strukturen. Er vertritt die Auffassung, daß alle diese Verbindungen von Spindelresten bzw. unvollkommenen Plasmateilungen abstammen, hat aber keine eigenen Untersuchungen darüber angestellt.

Leider haben sich sehr viele Termini für diese interzellulären Verbindungsstrukturen eingeführt — intercellular bridges, intercellular connections, attachment zones, Zwischenkörper, Zellkoppeln, Fusome — um nur einige zu nennen. Für alle interzellulären Verbindungen, die durch eine kreisförmige Öffnung der Zellmembran mit besonderer Differenzierung des Randes zustande kommen, wird

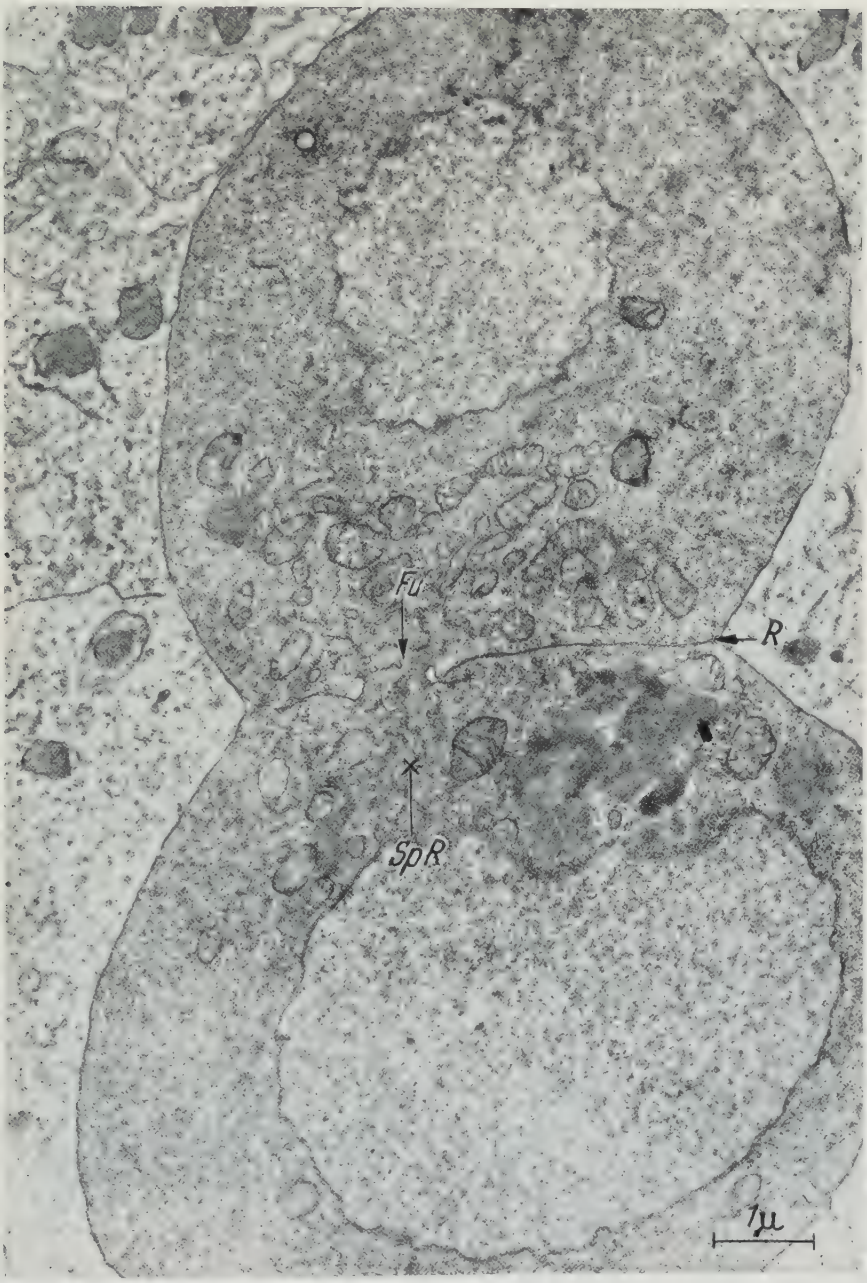

Abb. 1. Spermatogonien von *Drosophila*, 13200 ×. *Fu* Fusom, Ringfurche, *SpR* Spindelrestkörper

im Rahmen dieser Untersuchung in Anlehnung an die Terminologie HIRSCHLERs der Ausdruck „*Fusom*" verwendet. Eine genaue Beschreibung dieser Fusome im Ei-Nährzellverband, die sich gegenüber den interzellulären Brücken durch eine weitere Differenzierung auszeichnen, soll im Anschluß gegeben werden.

2. Material und Methodik

Ovarien und Hoden eines Wildstammes von *Drosophila melanogaster* wurden in Insektenringerlösung präpariert und in 1%iger OsO_4-Lösung fixiert. Einbettung über die Methanolreihe in Methacrylat. Die meisten Schnitte wurden in einer 0,1%igen Lösung von Uranylacetat kontrastiert und dünn mit Kohle bedampft. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Siemens-Elmiskop I.

3. Ergebnisse

Interzelluläre Brücken, die den von FAWCETT beschriebenen ähnlich sind, d. h. im Bereich der Öffnung eine stark osmiophile, ringförmige Verdickung aufweisen,

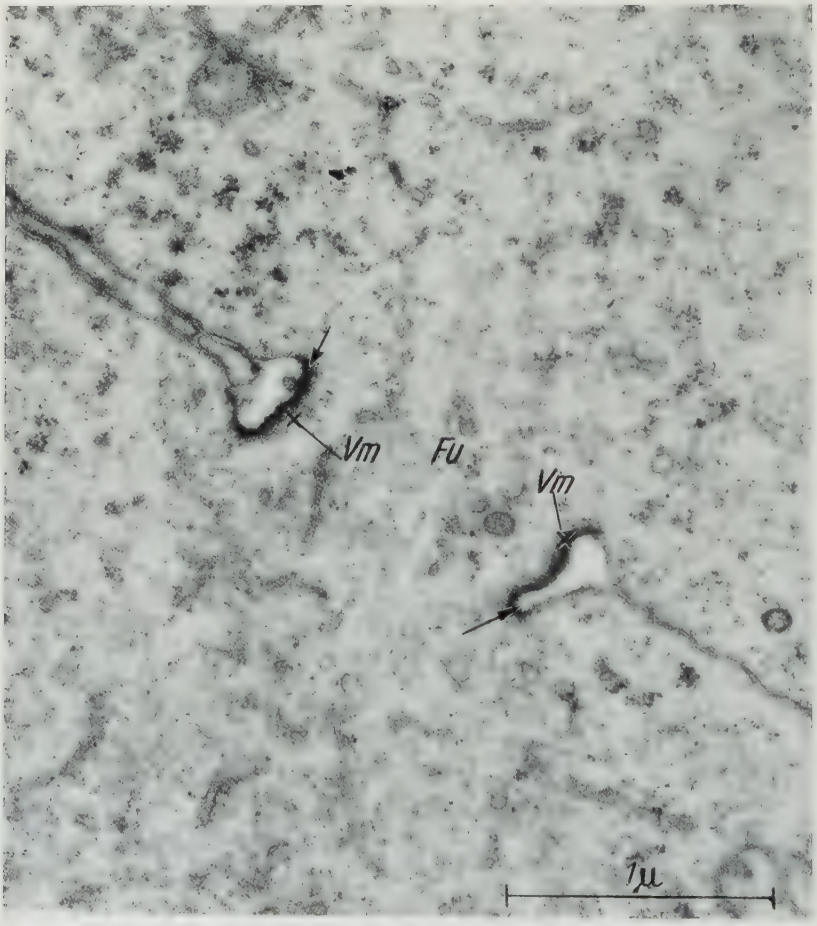

Abb. 2. Fusom zwischen Spermatocyten I von *Drosophila*, 35000×. *Fu* Fusom, → osmiophiler Verstärkungsring, *Vm* Verschlußmaterial

kommen auch bei *Drosophila* im Hoden vor (Abb. 1 und 2). Diese interzellulären Strukturen gibt es bei Spermatogonien und Spermatocyten. Dagegen sind Spermatiden über einfache, undifferenzierte Plasmabrücken miteinander verbunden. Neben dem üblichen Typ der Verbindung (Abb. 1 und 2) wurde noch eine andere Form beobachtet (Abb. 3). Hier liegt keine freie Kommunikation vor, wie in den vorher angeführten Fällen, vielmehr wird die Öffnung zwischen den beiden Zellen durch

eine weitgehend homogene, helle Plasmazone ausgefüllt. Wahrscheinlich schließt sich an die Zellteilung ein bestimmtes Stadium an, in welchem noch kein Austausch gröberer Plasmabestandteile, wie Mitochondrien oder Ribosomen, erfolgt. Bei dem die Öffnung ausfüllenden Plasmapfropfen handelt es sich vielleicht um einen in Auflösung befindlichen Spindelrest.

Von den interzellulären Brücken der Spermatogonien und Spermatocyten sind die des Ovars deutlich verschieden. In Abb. 4 sind solche Verbindungsstrukturen (*Fu*) zwischen der Eizelle und zwei ihrer Nährzellen zu sehen. Bei stärkerer Ver-

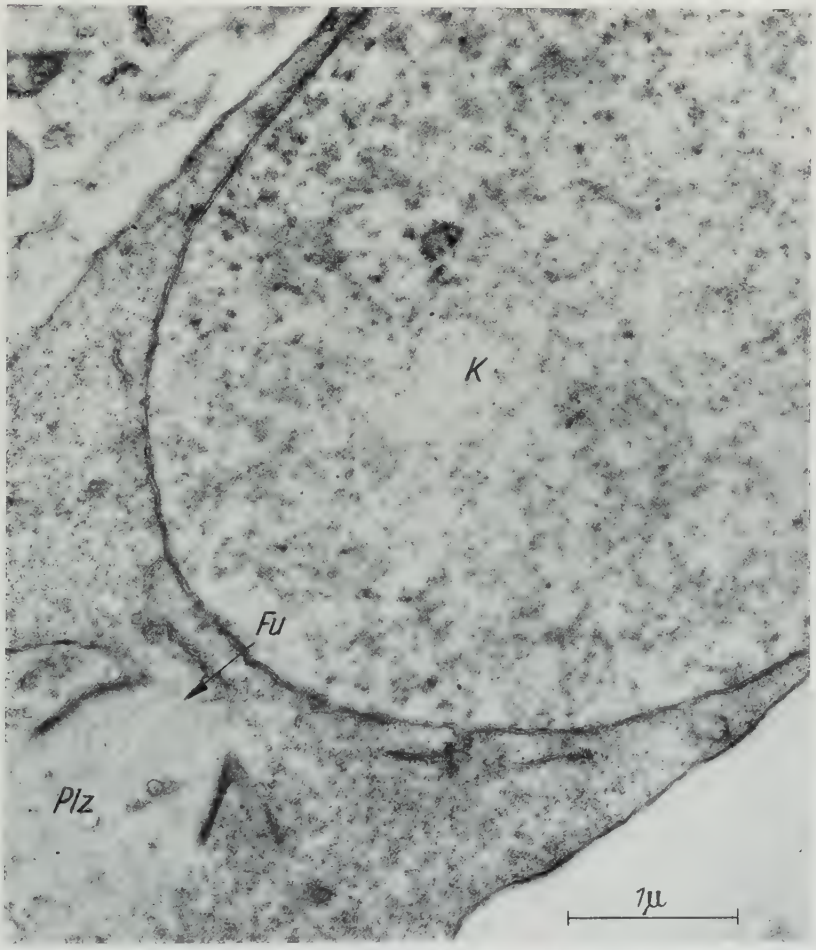

Abb. 3. Spermatogonie von *Drosophila*, 22000 ×. *K* Kern, *Fu* Fusom, *Plz* „helle" Plasmazone, vielleicht Spindelrest in Auflösung

größerung erscheint die Plasmamembran im Fusombereich umgebogen und spezifisch verändert (Abb. 5). Das stimmt mit den Verhältnissen im Hoden ungefähr überein. Es handelt sich wohl um eine Struktur, die der Stabilisierung solcher Öffnungen dient. Darüber hinaus jedoch findet sich an der Innenseite des Versteifungsringes eine Anhäufung von Material, das mehr oder weniger in das Lumen der Öffnung hineinragt (Abb. 4, 5, 6 und 7). Die Verbindung zwischen Ei- und

Nährzellen wird so teilweise oder ganz durch das genannte Material unterbrochen. Außerdem kommt es zum Aufbau einer, dem Verschlußmaterial eng anliegenden,

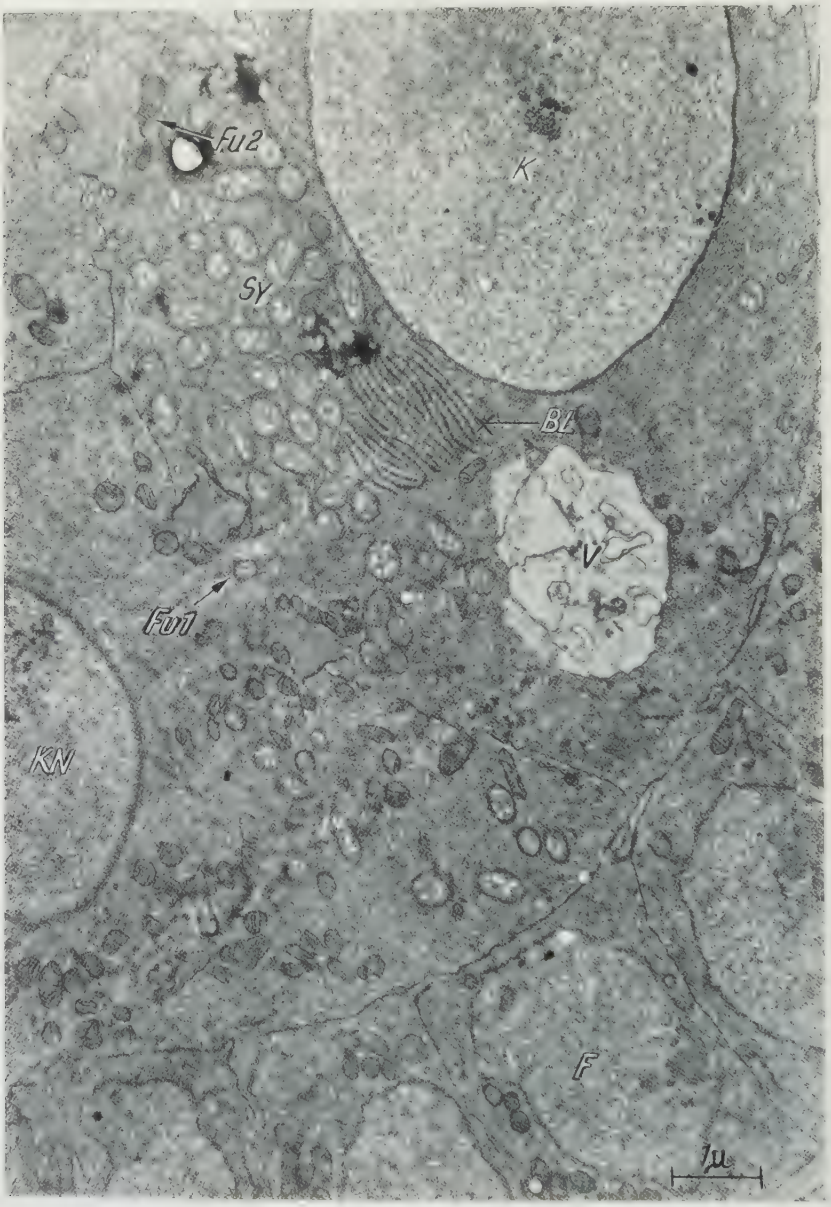

Abb. 4. Oocyte, Nähr- und Follikelzellen von *Drosophila*, 11000×. *K* Kern der Oocyte, *Fu1* Fusom geöffnet, *Fu2* Fusom geschlossen, *BL* basophile Lamellensysteme, *Sy* symbiontenähnliche Körper, *V* Vakuole, in allen Ei- und Nährzellen vorhanden, *F* Follikelzellen

unvollkommenen Plasmamembran (Abb. 5). Eine ganze Reihe unterschiedlicher Öffnungszustände aus einem Ei-Nährzellverband ist in Abb. 6 zu sehen. Bei *a* ist die Öffnung des Fusoms ganz von dem schon genannten „Verschlußmaterial"

ausgefüllt, bei *b* ist diese im mittleren Bereich leicht verengt (vgl. die keilförmige Struktur des Materials in Abb. 4). Die Fusome in *c* und *d* schließlich sind geöffnet.

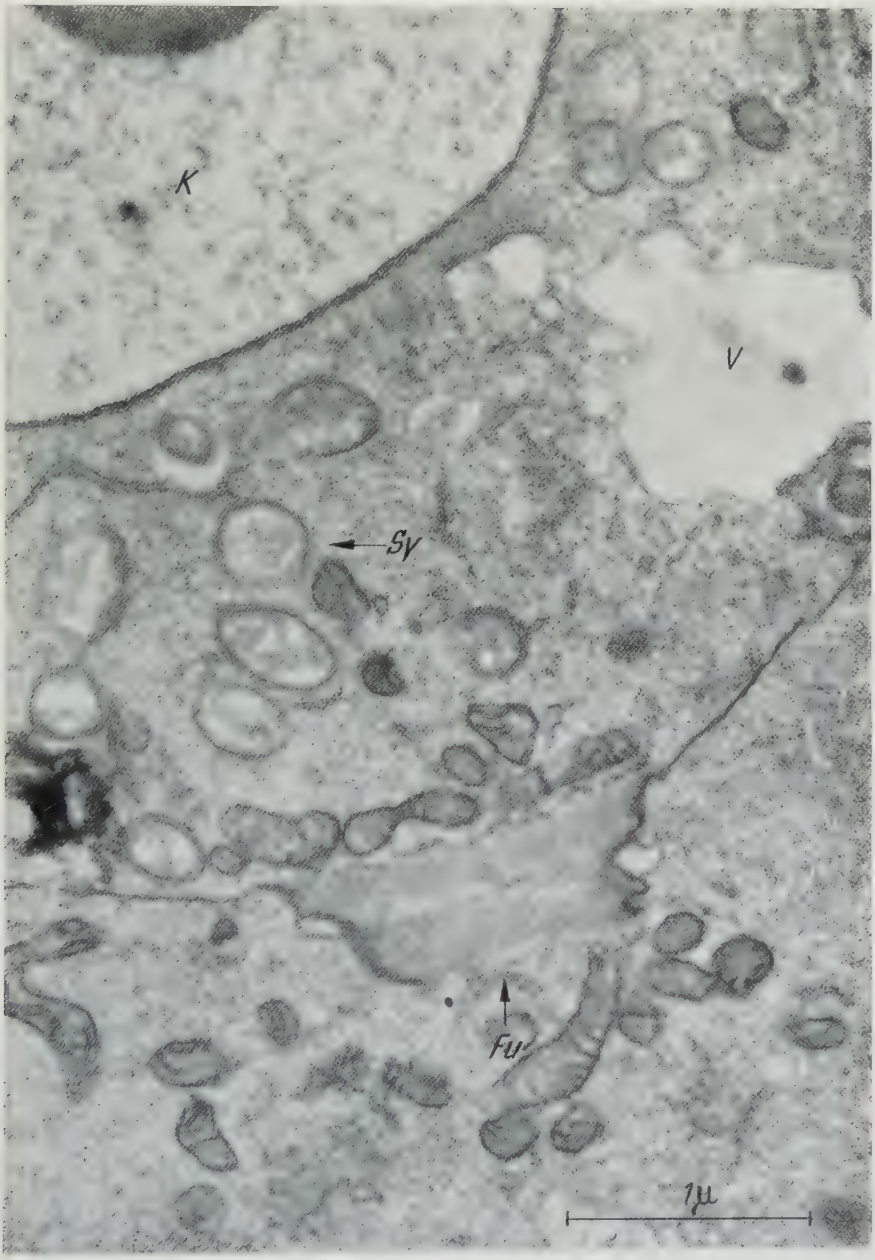

Abb. 5. Fusom geschlossen, 32000 ×. *K* Kern der Oocyte, *V* Vakuole, *Sy* symbiontenähnliche Körper, *Fu* Fusom

Das „Verschlußmaterial" ist bis auf einen Wulst am Rand der Öffnung reduziert, durch die in beiden Abbildungen (*c* und *d*) Mitochondrien hindurchtreten.

Messungen an Fusomen in Ei-Nährzellverbänden ungefähr gleichen Alters ergaben bei geöffnetem und geschlossenem Zustand annähernd den gleichen Durchmesser, sofern die Fusome median angeschnitten worden waren. Der maximale Durchmesser (z. B. 2 μ) entspricht der tatsächlichen Öffnung des Fusoms, nach unten abweichende Werte rühren von einer paramedianen Schnittführung her.

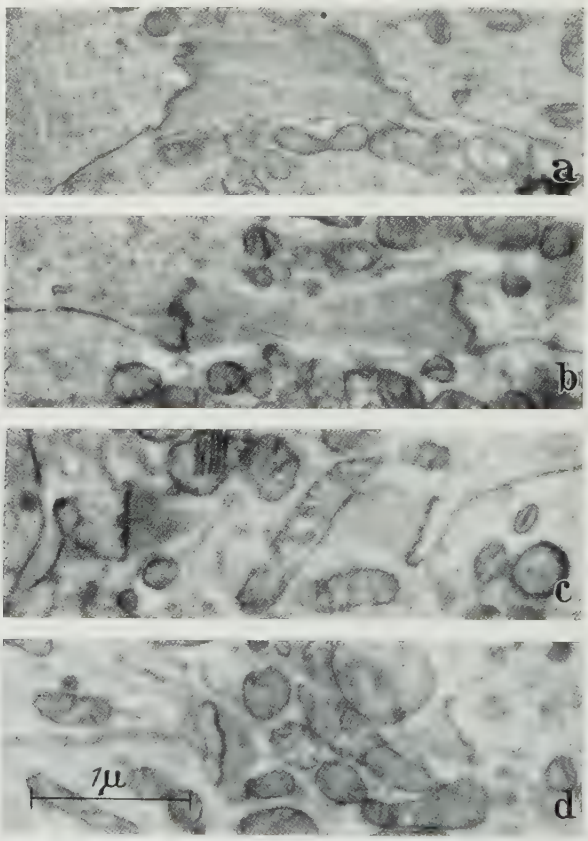

Abb. 6a—d. Verschiedene Öffnungszustände von Fusomen einer Eikammer, 21000×. a Fusom geschlossen, b mit Einschnürung in der Mitte, c in der Mitte geöffnet, Verschlußmaterial erstreckt sich keilförmig in die Öffnung hinein, Mitochondrien passieren das Fusom, d Fusom offen, das Verschlußmaterial ist bis auf einen Wulst am Versteifungsring verschwunden

Geschlossene Formen können demnach nur ausnahmsweise durch Tangentialanschnitte des Ringrandes und des Verschlußmaterials vorgetäuscht sein. Nach KING (1960) beträgt die Öffnung 4 μ bzw. 5 μ für die ganze Struktur einschließlich Ring, da es sich um ältere Ei-Nährzellverbände handelt (vgl. Abb. 11).

Auch im Lichtmikroskop können die Fusome beobachtet werden, besonders leicht in älteren Eikammern (Abb. 8); sie erweisen sich aber im Lebendpräparat als äußerst labile Strukturen. Ohne jede Schwierigkeit dagegen gelingt ihre Darstellung im gut fixierten Totalpräparat nach Boraxkarminfärbung. Unter günstigen Umständen bleiben sie auch im Quetschpräparat nach Carnoy-Fixierung und Karminessigsäurefärbung erhalten (BIER 1959).

Es war bisher ungeklärt, ob auch der hier beschriebene komplizierte Fusomtyp wie die einfachen interzellulären Brücken bei FAWCETT von einer unvollkommenen

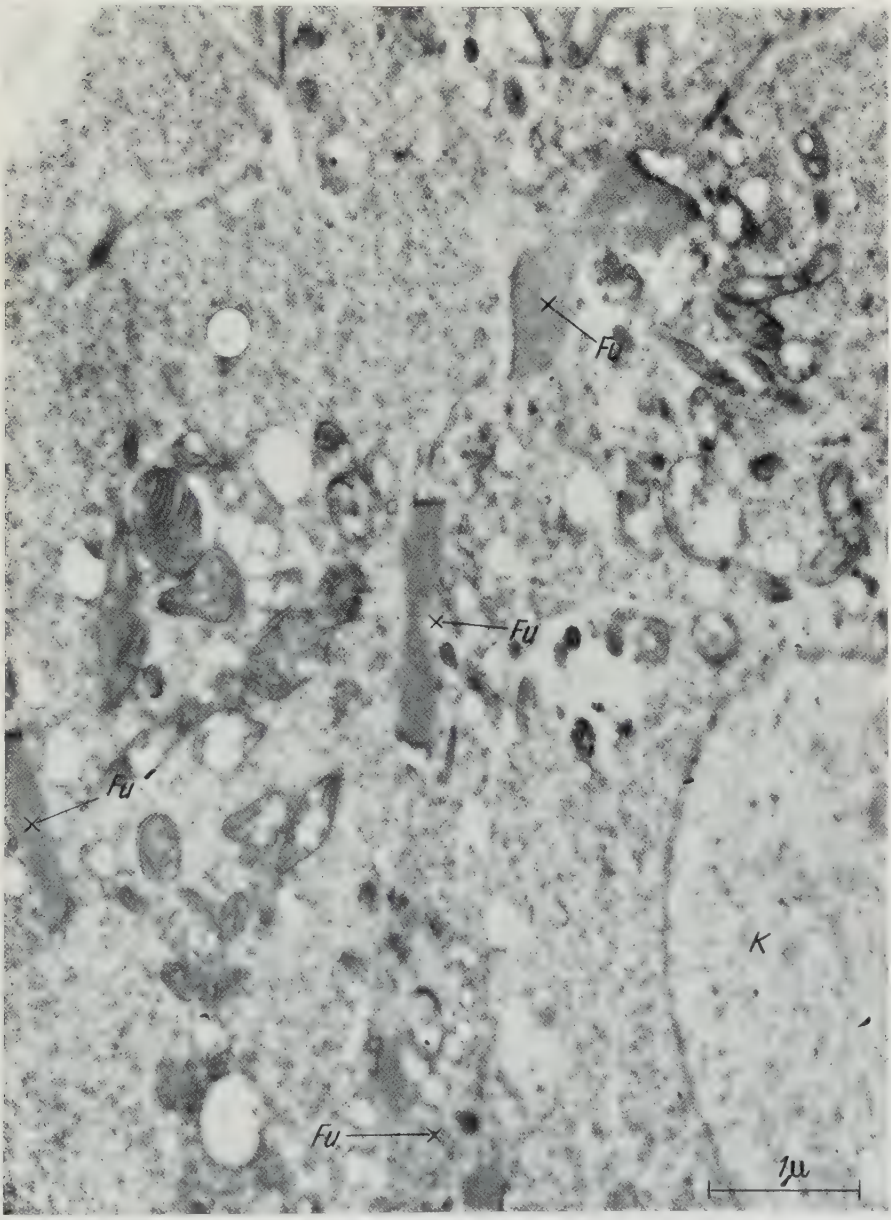

Abb. 7. Fusome im Germarium eines adulten Tieres, 20000×. Es sind 4 Fusome in unterschiedlichem Öffnungszustand sichtbar. Die Zelle mit dem Kern *K* ist im hier abgebildeten Teil über 3 Fusome mit den umgebenden Zellen verbunden. *Fu* Fusome

Zellteilung mit Einschluß eines Spindelrestes abgeleitet werden kann. Dieser Annahme stand entgegen, daß das Verschlußmaterial keine Ähnlichkeit mit einem Spindelrest hat. Es besteht vielmehr aus einem weitgehend homogenen und nur

stellenweise ganz schwach fibrillären, sonst sehr fein granulierten Material. Auch im distalen Teil des Germariums verbinden zahlreiche Fusome mit Verschlußmaterial die noch nicht als Ei-Nährzellverband differenzierten Zellen (Abb. 7). Hier findet man alle möglichen unterschiedlichen Öffnungszustände, doch überwiegen deutlich die geschlossenen Fusome. Es wurde also im Ovar adulter Tiere nur der hochdifferenzierte Fusomtyp beobachtet. Nur in den noch sehr kleinen Ovarien

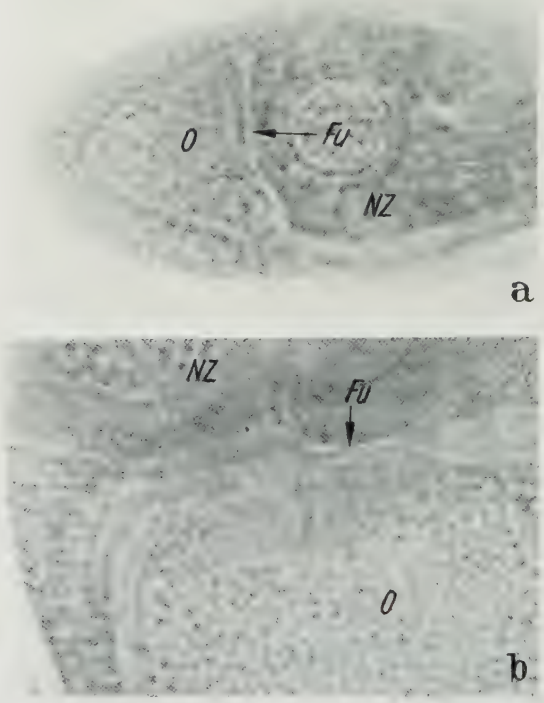

Abb. 8 a u. b. Fusome in älteren Eikammern, Fixierung CARNOY, Färbung mit Boraxkarmin, Totalpräparat, 400 ×. *NZ* Nährzellen, *O* Oocyten, *Fu* Fusome. Der Durchmesser beträgt in der jungen Eikammer (a) 6 μ, in der älteren (b) 10 μ

des dritten Larvenstadiums treten interzelluläre Brücken, wie die in Abb. 1 und 2 beschriebenen, auf, die einen Spindelrestkörper umfassen. Dieser ist aber weit lockerer gebaut und weniger osmiophil als das Verschlußmaterial der Fusome des adulten Tieres. Es erscheint demnach unwahrscheinlich, daß das Verschlußmaterial der eigentlichen Fusome mit dem Spindelrest identisch ist. Eine Erklärung seiner Entstehung ergibt sich bei Betrachtung der stark osmiophilen Verstärkungsleiste, die die Öffnung begrenzt. Hier erscheint als schmaler Saum osmiophiles Material, das als Verschlußmaterial in statu nascendi gedeutet werden kann (Abb. 9). Erst nach Auflösung des Spindelrestes — so scheint es jedenfalls — vermag es sich in die Öffnung hinein auszudehnen.

Nach den Vorstellungen von HIRSCHLER (1948, 1953) sollen speziell die Fusome des Ei-Nährzellverbandes von den Restkörpern der von ihm so benannten „Zentralspindeln" („Centrofusome") abstammen, die dessen Krümmung und die Lagebeziehung der Zellen bedingen. Unter „Zentralspindel" versteht HIRSCHLER solche

Spindelreste, die die gemeinsame Zellachse mehrerer Zellen bilden. Solche „Zentralspindeln" waren im dritten Larvenstadium nicht vorhanden. Dagegen fanden sich im larvalen Ovar von *Tipula* ganze Zellkomplexe, die über einen langen, mehrere Zellen verbindenden Spindelrest zusammenhingen (Abb. 10).

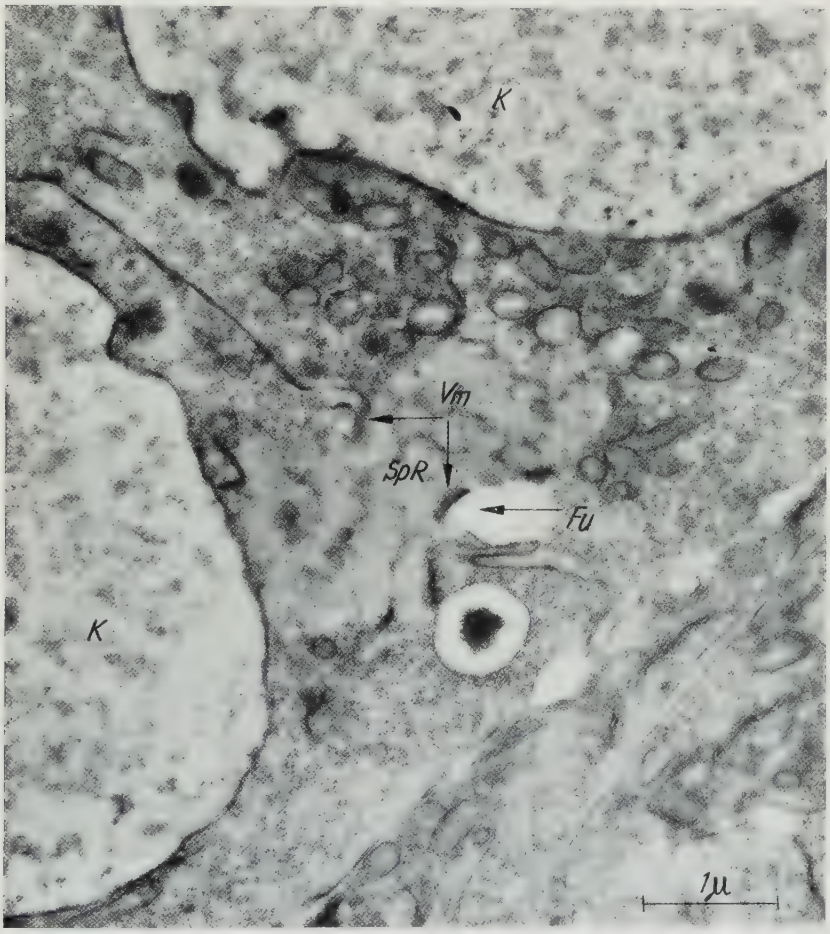

Abb. 9. Fusom in der larvalen Ovaranlage (3. Larvenstadium) von *Drosophila*, 18000×. *K* Kerne, *SpR* Spindelrestkörper, *Fu* Fusom, *Vm* Beginn der Produktion von Verschlußmaterial

4. Diskussion

Verbindungen zwischen Ei und Nährzellen, die dem Transport von Nährstoffen und auch von bereits strukturierten Plasmabestandteilen in das schnell wachsende Ei dienen, sind wiederholt beschrieben worden (vgl. Weber 1933 und Eidmann 1941). Die Voraussetzung für den Übertritt von größeren geformten Plasmapartikeln (z. B. Mitochondrien) sind entsprechende Perforationen de Plasmamembran. Es liegen hier im Ei-Nährzellverband also andere Verhältnisse vor als in den Syncytien des Hodens, wo die Kontinuität protoplasmatischen Materials in erster Linie wahrscheinlich der Synchronisierung in der Entwicklung dient. Trotz der grundsätzlichen, strukturellen Ähnlichkeit von interzellulären

Brücken und Fusomen ergaben sich auch Zweifel, ob sich beide wenigstens morphologisch homologisieren lassen. Im larvalen bzw. präpupalen Ovar entstehen die

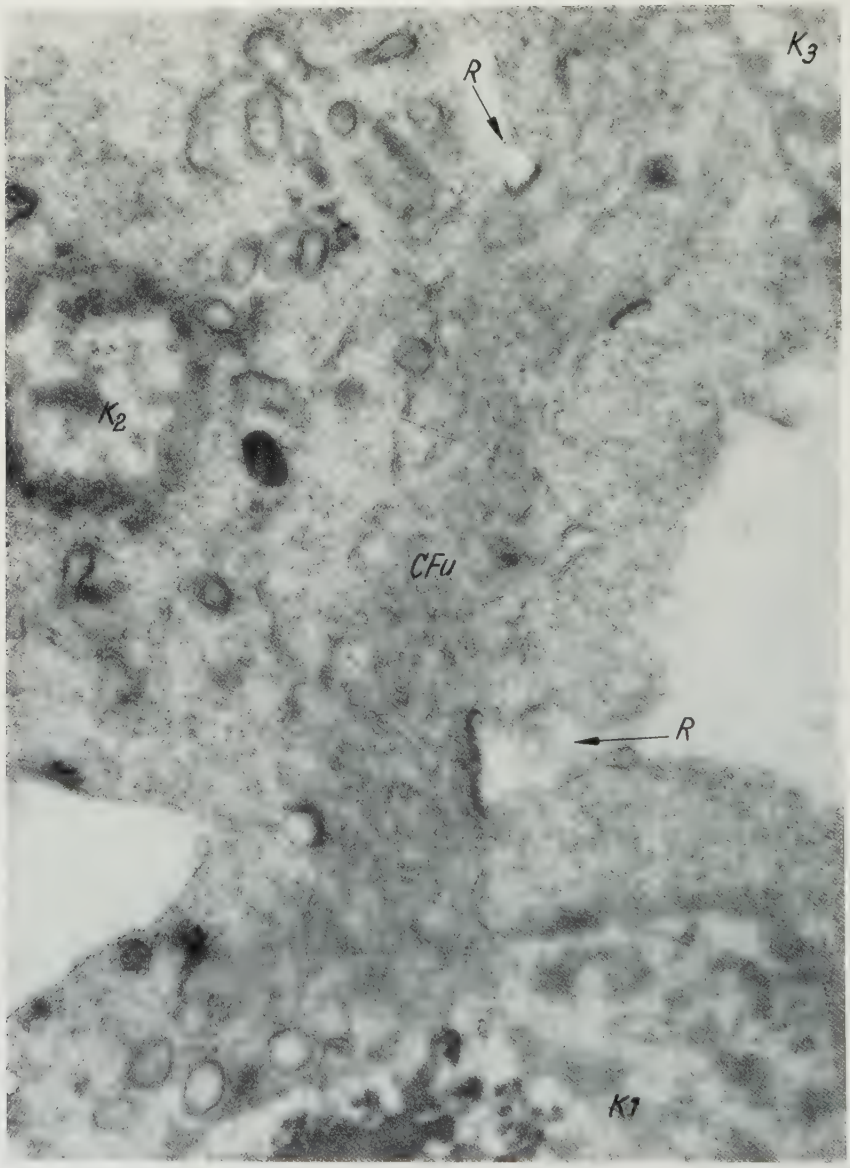

Abb. 10. „Centrofusom" im Ovar von *Tipula paludosa*, 17 600 ×. *Fu 1*, *Fu 2* Fusome zwischen 3 Zellen, die über das Centrofosum („Zentralspindel") *CFu* miteinander verbunden sind. *K 1*, *K 2*, *K 3* Kerne von Ei- bzw. Nährzellen, die auf diesem Stadium noch nicht unterschieden werden können, *R* Ringfurche

Verbindungen als Folge von unvollkommenen Plasmateilungen der Oogonien (vgl. Abb. 9 und 10) und ermöglichen zusätzlich über die „Zentralspindel" bestimmte Ordnungsvorgänge im Verlauf der Differenzierung des Ei-Nährzellverbandes (vgl. Abb. 10). Im imaginalen Ovar dagegen, wo die endgültige Ausdifferenzierung der

Eianlagen das Bild beherrscht (Oogonienmitosen fehlen), werden nach den vorliegenden Befunden die fusomalen Beziehungen unübersichtlicher. Wie in Abb. 7 zu sehen ist, sind im Germarium schon vor der deutlichen Abgrenzung der Eikammern so viele Fusome vorhanden, daß die Annahme in Frage gestellt wird, ob sie alle aus Spindelrestkörpern entstanden sind. Nach dem Eintritt der Zellen

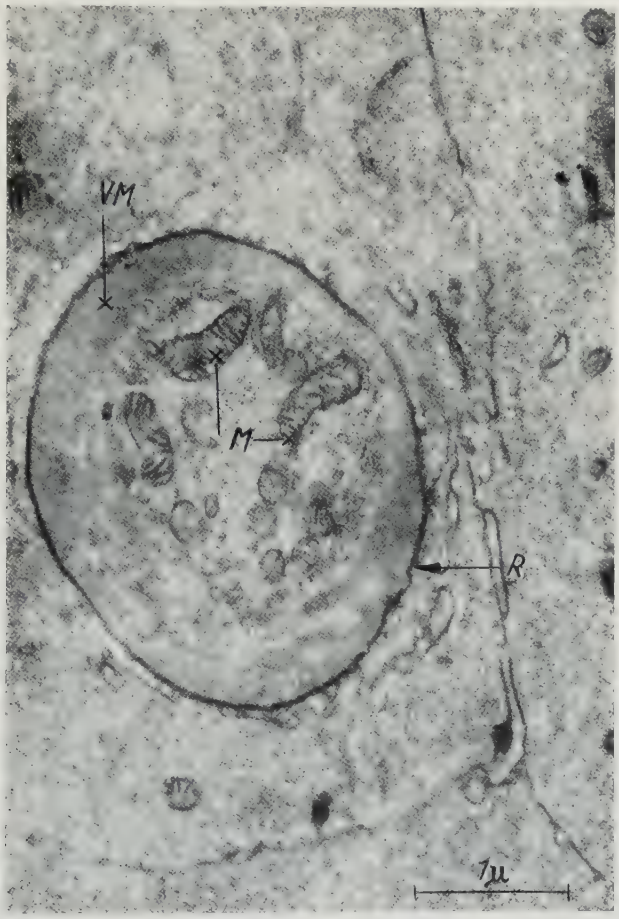

Abb. 11. Fusom in einer älteren Eikammer, 20000 ×. *R* osmiophiler Ring, als Verstärkungsleiste gedeutet, *VM* Verschlußmaterial, *M* Mitochondrien bei Durchtritt durch die Öffnung

in das Vitellarium wird die Anzahl der Fusome reduziert. In jungen Eikammern sind auch Nährzellen noch über Fusome miteinander verbunden, später beschränken sich die Fusome auf die Plasmamembran zwischen Ei- und Nährzellen. Der Durchmesser der Fusome schwankt. Das Mittel liegt bei 2 μ, kann aber in älteren Eikammern bis auf 10 μ ansteigen (Abb. 8, 11). Da demnach Zahl, Lagebeziehung und Größe der Fusome im Verlauf des Wachstums der Eikammern beträchtlichen Veränderungen unterliegen, handelt es sich vielleicht doch nur zum Teil um analoge Strukturen zu den frühen larvalen und pupalen Fusomen. Auch Hirschler (1948) hält die sekundäre Entstehung von Fusomen ohne Zusammenhang mit dem Spindelrest für möglich. Es besteht also durchaus die Wahrscheinlichkeit,

daß es sich um besondere Zellorgane des Ei-Nährzellverbandes handelt, durch die erst der Transport größerer Bestandteile des Nährstromes in Richtung zur Eizelle erfolgen kann. Über das weitere Schicksal der Fusome im reifenden Ei-Nährzellverband kann noch nichts Sicheres ausgesagt werden. Für solche Stadien, bei denen das Ei die Hälfte oder zwei Drittel der Eikammer ausfüllt, liegen nur lichtmikroskopische Beobachtungen vor. Im Totalpräparat erscheint zwischen den Nährzellen am Pol der Kammer und der großen Eizelle eine einzige Perforation, die elektronenmikroskopisch aber nicht untersucht wurde.

Es bleiben noch einige Überlegungen über die als Verschlußmaterial bezeichnete Substanz anzustellen, die in wechselndem Maße die Öffnung des Fusoms ausfüllt. Daß es sich hierbei nicht um Material des Spindelrestkörpers handeln kann, wurde schon erwähnt. Es ist vielmehr ziemlich sicher, daß dieses Material erst zu dem spezifischen Zweck des Schließens der Fusome gebildet wird, wenn auch der Beweis an Hand einer elektronenmikroskopischen Analyse allein natürlich nicht erbracht werden kann. Für diese Deutung sprechen die sehr unterschiedlichen Öffnungszustände der Fusome bei den Zellen ein- und desselben Ei-Nährzellverbandes. Aus dem gleichen Grunde können die Fusome des Ei-Nährzellverbandes auch nicht als Strukturen betrachtet werden, die der bloßen Synchronisierung dienen, wie z. B. im Hoden. Es muß sich bei dem hochdifferenzierten Fusomtyp um eine den Durchtritt von Zellmaterial nicht nur ermöglichende, sondern auch regulierende Struktur handeln. Diese Regulation kommt über die Neusynthese bzw. Auflösung der Verschlußsubstanz zustande, bzw. über den jeweiligen Gleichgewichtszustand dieser beiden Faktoren. Die Verschlußsubstanz wird wahrscheinlich vom osmiophilen Verstärkungsring gebildet (Abb. 2 und 9). Der Abbau könnte durch von der Nährzelle hervorgebrachte Enzyme geregelt werden. Auf eine dynamische Wechselwirkung zwischen Aufbau und Abbau deuten auch die offenen Fusome hin, bei denen immer ein kleiner Teil des Verschlußmaterials am Ring erhalten ist. So gesehen mag es sich auch bei den interzellulären Brücken des Hodens, die einen ähnlichen Bau besitzen, um Fusome handeln, die von der Zelle ständig in geöffnetem Zustand gehalten werden (vgl. Abb. 2). Da außerdem angenommen werden kann, daß es sich bei der Weitergabe deutoplasmatischer Produkte der Nährzellen nicht um einen kontinuierlichen, sondern um einen schubweisen Vorgang handelt, der zwischen Synthese in den Nährzellen und Ausstoßung des synthetisierten Materials in die Eizelle schwankt, erscheint ein regulierbarer Verschlußmechanismus während des Ablaufs der Synthese sinnvoll und zweckmäßig.

Wir haben also in diesen Fusomen des Ei-Nährzellverbandes eine spezialisierte Form der einfacheren intercellulären Brücke vor uns, die den besonderen physiologischen Verhältnissen im Ei-Nährzellverband angepaßt ist.

Summary

1. A detailed description is given of the structure of intercellular bridges connecting sister spermatogonia and spermatocytes in the testis as well as oocytes and nurse cells in the ovary of *Drosophila melanogaster*.

2. The differentiated type of intercellular bridge found in the ovary is called „*fusom*“, using a term introduced by Hirschler (1948, 1953). The fusoms differ

from simple intercellular bridges by the fact that the opening is more or less closed by a specific sealing substance.

3. The sealing material seems to be produced by the stiff osmiophilic rim bordering the opening of the fusom.

4. Presumably the aperture of the fusom is controled by factors originating in the nurse cells, since both closed and opened fusoms are found to connect the same oocyte with different nurse cells.

Literatur

Bauer, H.: Der Aufbau der Chromosomen aus den Speicheldrüsen von *Chironomus Thummi* Kiefer. Z. Zellforsch. **23**, 280—313 (1935).

Bier, K. H.: Pers. Mitteilung 1960.

Demerec, M.: Biology of *Drosophila*. New York: J. Wiley & Sons Inc. 1950.

Eidmann, H.: Lehrbuch der Entomologie. Berlin: Paul Parey 1941.

Fawcett, Don, W., I. Susumo and D. Slautterback: The occurrance of intercellular bridges in groups of cells exhibiting synchronous differentiation. J. biophys. biochem. Cytol. **5**, 3, 453—460 (1959).

Grimley, Ph. M.: The ultrastructure of cardiac desmosomes in the toad and their relationship to the intercalated disc. J. biophys. biochem. Cytol. 8, 2, 305—318 (1960).

Hama, K.: The fine structure of the desmosomes in frog mesothelium. J. biophys. biochem. Cytol. **7**, 575—578 (1960).

Hirschler, J.: Über eine Reihe von auf ihre fusomale Natur verdächtiger Zelleinrichtungen (Beiträge zum Fusomproblem). Ergebn. Zool. 8, 329—414 (1935).

— Gesetzmäßigkeiten in den Ei-Nährzellverbänden. Zool. Jb. **61**, 141—236 (1948).

— Über den Anteil des Fusoms an dem Zustandekommen des Bukettstadiums und der bilateralen Symmetrie im tierischen Ei. Zool. Jb. **64**, 514—537 (1953).

Horstmann, E., u. A. Knoop: Elektronenmikroskopische Studien an der Epidermis. I. Rattenpfote. Z. Zellforsch. **47**, 348—362 (1958).

Karrer, H. E.: Cell interconnections in normal human cervical epithelium. J. biophys. biochem. Cytol. **7**, 1, 181—183 (1960).

King, R. C.: Oogenesis in adult *Drosophila melanogaster*. IX. Studies on the cytochemistry and ultrastructure of developing Oocytes. Growth **24**, 265—323 (1960).

Miller, A.: Siehe M. Demerec.

Odland, G. F.: The fine structure of the interrelationship of cells in human epidermis. J. biophys. biochem. Cytol. **4**, 525—538 (1958).

Porter, K. R.: Observations on the submicroscopic structure of animal epidermis. Anat. Rec. (Abstract) **118**, 433 (1954).

Selby, C. C.: An electron microscope study of the epidermis of mammalian skin in thin sections. I. Dermo-epidermal junction and basal cell layer. J. biophys. biochem. Cytol. **1**, 429—443 (1955).

Strugger, S.: Der elektronenmikroskopische Nachweis von Plasmodesmen mit Hilfe der Uranylimprägnierung an Wurzelmeristemen. Protoplasma **48**, 231—236 (1957).

— Elektronenmikroskopische Beobachtungen an den Plasmodesmen des Urmeristems der Wurzelspitze von *Allium cepa*; ein Beitrag zur Kritik der Fixation und zur Beurteilung elektronenmikroskopischer Größenangaben. Protoplasma **47**, 365—367 (1957).

Weber, H.: Lehrbuch der Entomologie. Jena: Gustav Fischer 1933.

Dr. Günther F. Meyer, Max Planck-Institut für Biologie, Abt. Beermann, Tübingen, Spemannstraße 34

Zeitschrift für Zellforschung 54, 252—261 (1961)

Aus der Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der Freien Universität Berlin
(Leiter: Prof. Dr. med. Willy Schwarz)

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN AN DER SINUSWAND MENSCHLICHER FETALER LEBERN

Von

Peter-Michael Carsten*

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 6. Februar 1961)

Einleitung

Die Sinuswand der Leber, ihr Aufbau aus Endothel- und v. Kupfferschen Sternzellen und ihre Verankerung im Leberparenchym, ist ein umstrittenes Gebiet der Forschung. Seit den Untersuchungen von Mayer (1899) und Minot (1900), nach denen das Endothel der Sinuswand aus einzelnen verzweigten Endothelzellen gebildet wird und den Arbeiten von v. Kupffer (1899) und Ranvier (1892), die von einem perforierten Syncytium sprechen, haben zahlreiche lichtmikroskopische, histochemische und cytologische Untersuchungen keine Klärung der strittigen Fragen bringen können (Aterman 1958). Auch die elektronenmikroskopischen Befunde befriedigen bisher nicht. Rouillier (1954, 1956), Fawcett (1955), Parks (1956), Rüttner und Vogel (1957), Hampton (1958), Cossel (1959), Lanzavecchia (1959) und Schmidt (1960) konnten nachweisen, daß die Sinuswand diskontinuierlich ist und daß eine Basalmembran fehlt. Sie zeigten ferner, daß der von Disse (1890) beobachtete und irrtümlich als Lymphscheide angesehene Raum tatsächlich vorhanden ist. Braunsteiner u. Mitarb. (1953, 1957) bestreiten jedoch die Existenz des sog. Disseschen Raumes. Wassermann (1958) hat zwar auch den Disseschen Raum beobachtet, glaubt jedoch an die Kontinuität des Endothels. Es betrachtet den Disseschen Raum samt Fibrillen und Kittsubstanz der Gitterfasern als „funktionelle Basalmembran". Aus den genannten Arbeiten geht aber nicht hervor, ob man in der Sinuswand zwischen Endothel- und v. Kupfferschen Sternzellen unterscheiden muß. Schmidt beschreibt für die Sinuswand der Maus 3 Formen von Endothelzellen, nämlich zwei auskleidende Zelltypen und die Kupfferschen Sternzellen. Mehrere Untersucher, wie Fawcett, Rüttner und Vogel sowie Cossel sehen die Leberparenchymzellen an das Sinuslumen unmittelbar angrenzen. Sie deuten diese Erscheinung als Artefakt bzw. als Loslösung von Sternzellen.

Kenntnisse vom Aufbau der Sinuswand sind deshalb so wichtig, weil die Art der Blutgewebeschranke für viele Prozesse in der Leber von Bedeutung ist. Das gilt auch für die Leber des Embryos, in der außerdem zeitweise die Blutbildung vor sich geht. Elektronenmikroskopische Untersuchungen der embryonalen Sinuswand liegen jedoch nicht vor. Die Darstellung der Feinstruktur der fetalen Lebersinuswand könnte die späteren eigentümlichen Verhältnisse verständlich machen. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen an Lebern menschlicher Feten soll deshalb der Bau der Sinuswand ermittelt werden.

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Material und Methoden[1]

Zur Untersuchung gelangten die Lebern von 6 menschlichen Feten mit einem Alter von Mens II—V. Nach Fixierung in einer 1% OsO_4-Tyrodelösung, die mit $NaHCO_3$ auf einen pH von 8 gebracht wurde (S. Fitton Jackson, 1958), wurde in einem Methacrylsäuregemisch 30:70 eingebettet. Die Dünnstschnitte stellten wir auf Porter-Blum-Mikrotomen her und färbten mit einer 1% Uranylacetatlösung nach. Ein Teil der Blenden wurde hinterher mit Kohle bedampft (Watson, 1957).

Alle Aufnahmen wurden mit einem Zeiss-Elektronenmikroskop vom Typ EM 8/II bei einer Strahlspannung von 40—50 kV gemacht. Zur lichtmikroskopischen Betrachtung wurde ein Teil der Präparate in üblicher Weise in Paraffin eingebettet und geschnitten. Diese Schnitte wurden mit Hämalaun-Eosin und Azan angefärbt.

Befunde

Schon bei 10 Wochen alten Feten wird das Sinuslumen von einer einschichtigen Endothellage begrenzt. Zwischen ihr und den benachbarten Leberzellen liegt ein Spalt, der als Dissescher Raum aufzufassen ist. Seine Breite ist beträchtlich; sie schwankt zwischen 800 Å und 2,5 μ (Abb. 1).

Das Endothel, das die Sinuswand bildet, besteht aus zwei Zelltypen, den Endothelzellen und den Kupfferzellen. Die meisten Zellen gehören zu den Endothelzellen. Sie haben breite und flache Cytoplasmaausläufer in Richtung der Sinuswand, die sich so überlappen und verzahnen können, daß die Grenzen zwischen den einzelnen Ausläufern nicht immer exakt auszumachen sind. Die Sinuswand wird dadurch an diesen Stellen zu einem Raumgitter, das kleine und verschlungene Gitterlücken besitzt. Mitunter finden sich auch größere Lücken zwischen den Endothelzellen, die eine sichtbare Verbindung zwischen Sinuslumen und perisinusoidalem Raum herstellen (Abb. 1, 2). Die Weite dieser Öffnungen schwankt zwischen 100 Å und 1 μ. Zum Sinuslumen hin haben die Endothelzellen, im Gegensatz zu den Kupfferzellen, eine glatte Zellwand. Nach dem Disseschen Raum zu besitzen die einfachen Endothelzellen dagegen kurze Cytoplasmafortsätze, die in den Disseschen Raum hineinhängen; ihr Durchmesser schwankt zwischen 320 Å und 200 mμ bei einer Länge von ungefähr 800 mμ. Die Endothelzelle hat ein wenig dicht erscheinendes Cytoplasma, in dem vereinzelt Spuren eines endoplasmatischen Retikulums vorkommen. Dieses endoplasmatische Retikulum ist nicht immer mit einem Besatz von Paladegranula ausgestattet. Diese finden sich auch ohne räumliche Beziehung zum endoplasmatischen Retikulum frei im Cytoplasma. Mitochondrien vom Cristatyp kommen ebenfalls vereinzelt vor, Golgizonen sind selten. Im Cytoplasma der langen Zellausläufer liegen mitunter Vesiculae mit und ohne Besatz von Paladegranula. Das Cytoplasma der fingerförmigen Zellfortsätze erscheint dagegen hell und ist leicht granuliert. Der ovale Kern dieses Zelltyps hat eine doppelte Kernmembran und enthält osmiophile Granula verschiedener Dichte, die an einigen Stellen gehäuft vorkommen (Abb. 3).

Die Kupfferzellen, die meistens in den Sinusecken zwischen zwei Leberparenchymzellen liegen, haben kürzere Zellfortsätze als die eigentlichen Endothelzellen. Ihre Oberfläche ist gelegentlich gezackt oder glatt. Die Fortsätze können

[1] Für die Überlassung des Materials danken wir Herrn Doz. Dr. H.-W. Boschann, Chefarzt der Geburtsh.-gynäkolog. Abt. des Rudolf-Virchow-Krankenhauses Berlin und Herrn Prof. Dr. H. Lax, Chefarzt der Geburtsh.-gynäkolog. Abt. des Städt. Krankenhauses Berlin-Moabit.

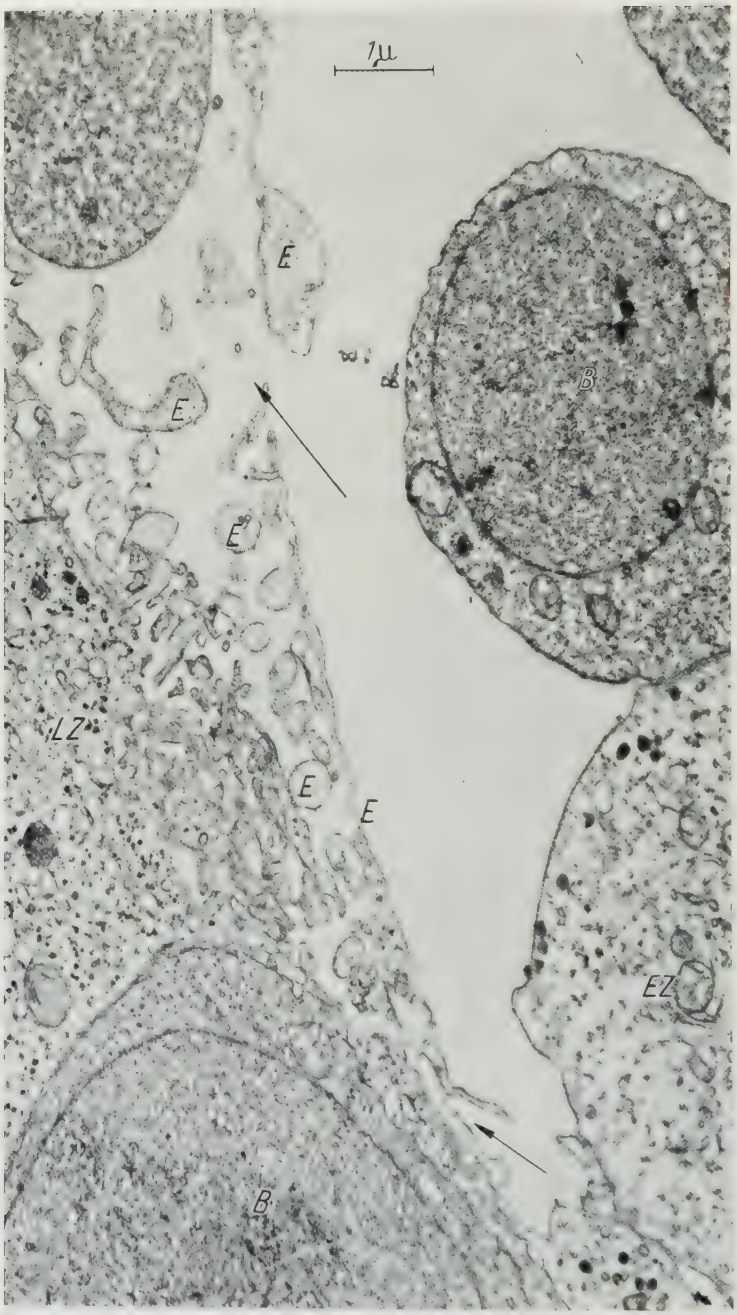

Abb. 1. Sinuswand aus der Leber eines 3 Monate alten menschlichen Embryos. Zwischen Endothelfortsätzen (*E*) und Leberzellen (*LZ*) bzw. Blutbildungszellen (*B*) deutlich sichtbarer perisinusoidaler Raum. Poren in der Sinuswand (Pfeile). 1:12500

jedoch im Gegensatz zu denen der gewöhnlichen Endothelzellen in das Sinuslumen hineinragen (Abb. 4). Ein Teil dieser Kupfferzellen liegt unter den Zell-

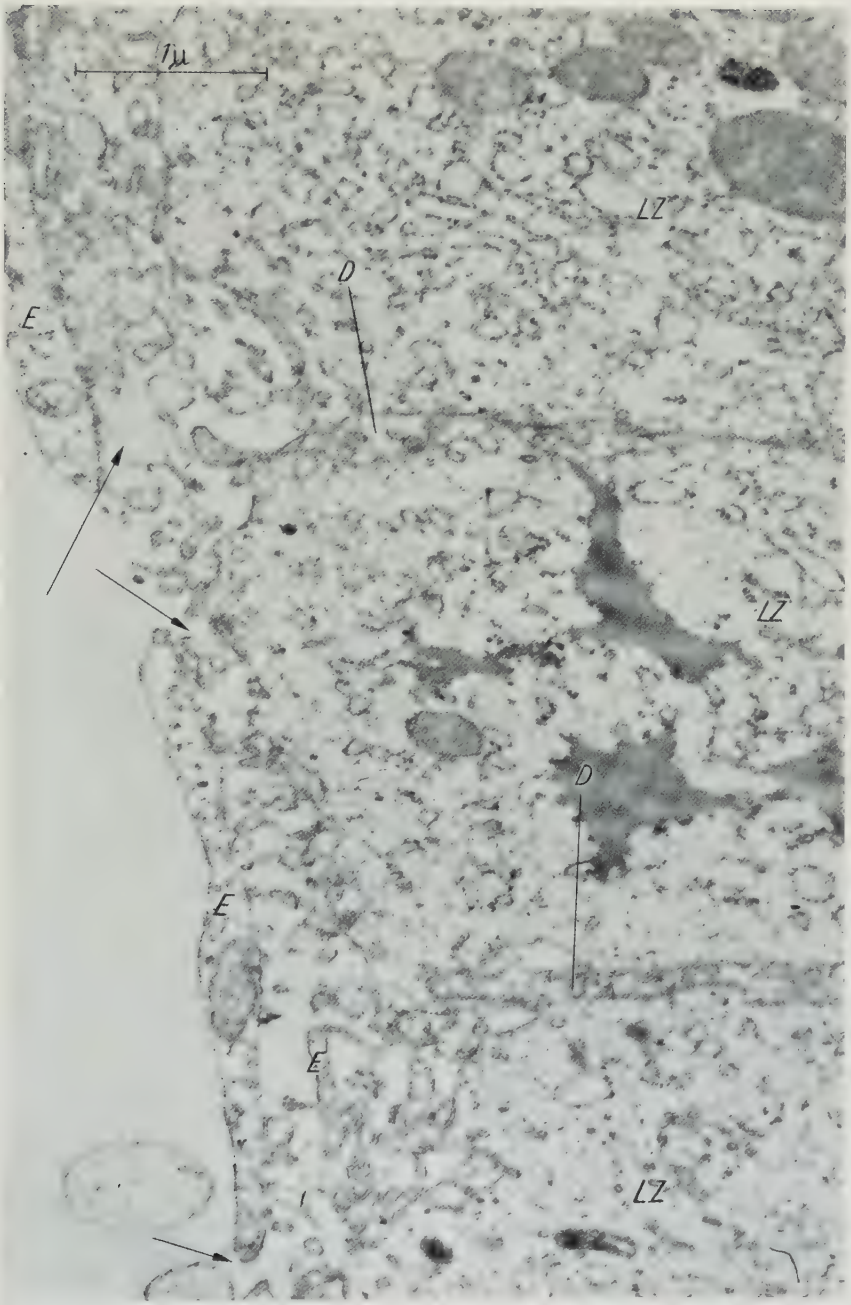

Abb. 2. Sinusendothelwand (*E*) aus der Leber eines 3 Monate alten menschlichen Embryos. Poren und Lücken in der Endothelwand (Pfeile). Gut erkennbarer perisinusoidaler Raum, in den Zellfortsätze und Microvilli hineinhängen; *D* erstreckt sich auch zwischen die Leberzellen (*LZ*). 1:25000

ausläufern der benachbarten Endothelzellen. An ihnen fällt besonders der vielgestaltige dunkle Kern auf. Das Karyoplasma besteht aus osmiophilen Granula,

die besonders in der Nähe der Kernmembran angereichert sind. Wie in den gewöhnlichen Endothelzellen kommt ein spärliches endoplasmatisches Retikulum

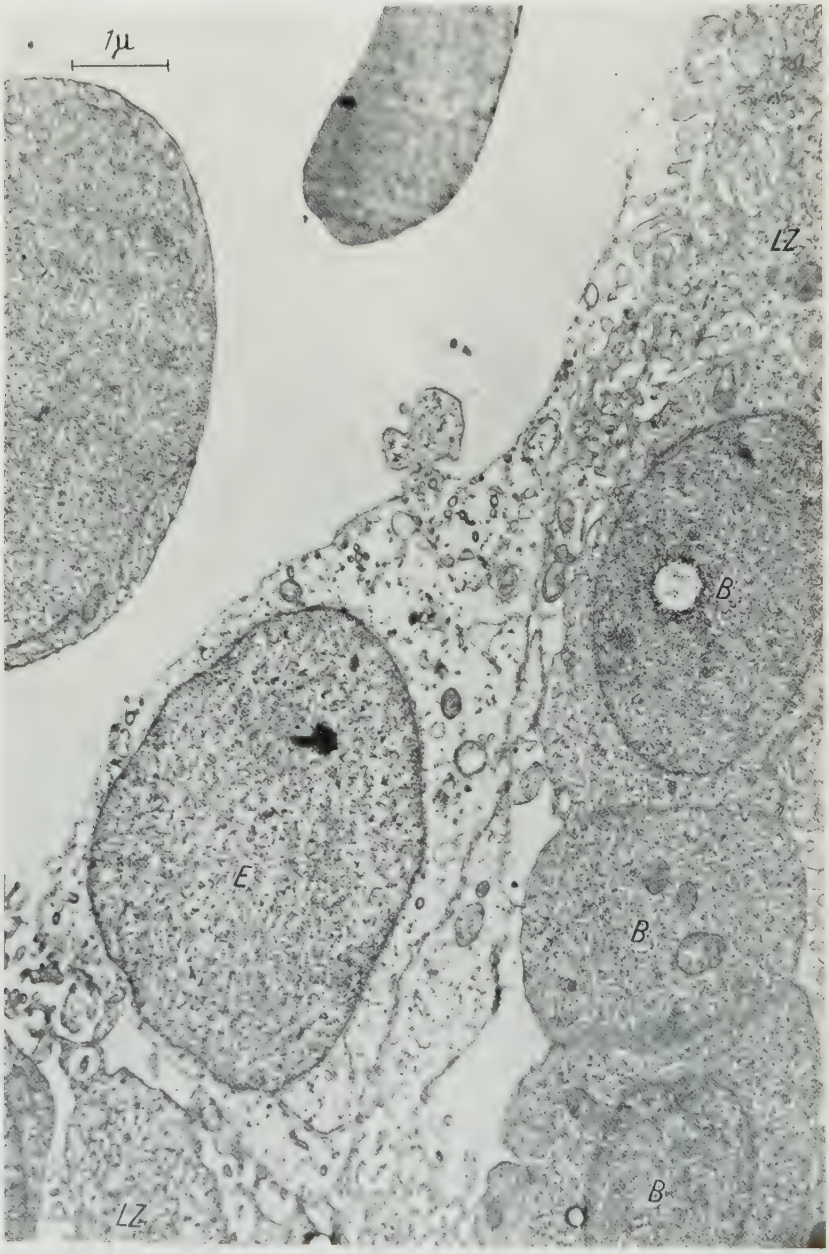

Abb. 3. Zelleib einer Endothelzelle (*E*) aus der Leber eines 10 Wochen alten menschlichen Embryos. Dissescher Raum auf der Leberseite von Blutbildungszellen (*B*) begrenzt. Leberzelle mit Microvilli (*LZ*). 1:12500

vor, sei es mit oder ohne Besatz von Paladegranula. Unscheinbare Golgizonen können vorhanden sein. Mitochondrien findet man häufiger als in den gewöhn-

lichen Endothelzellen. Sie liegen in der Nähe von Zisternen, die die Größe von Zellkernen erreichen können. In diesen Zisternen und Vesiculae ist eine leicht

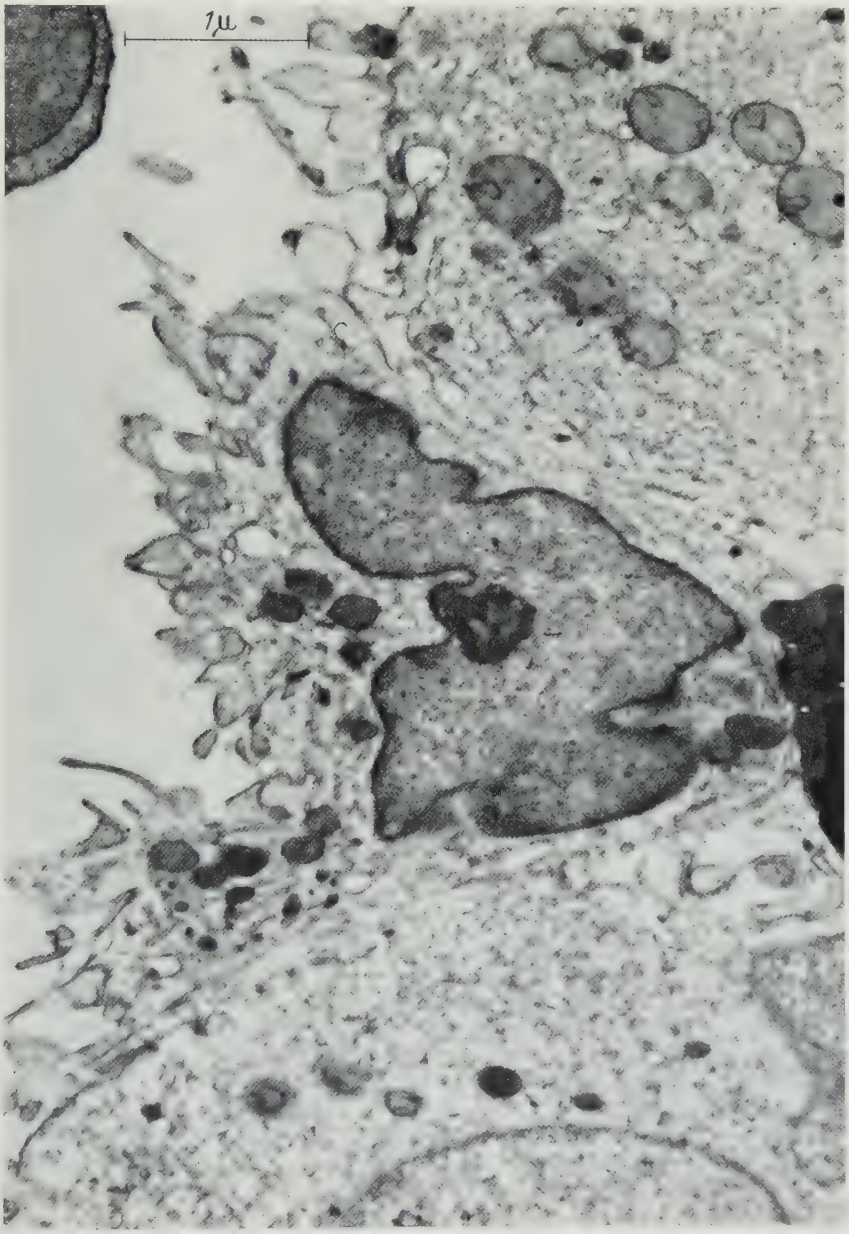

Abb. 4. Kupffer-Zelle aus dem Sinusendothel der Leber eines 3 Monate alten menschlichen Feten. Unregelmäßige Zelloberfläche. Vielgestaltiger dunkler Kern. Unterschiedlich osmiophile Zelleinschlüsse. 1:24000

granulierte osmiophile Substanz von verschiedener Dichte zu beobachten. Die Wand der Zisternen wird von einer auffallend stark osmiophilen Membran

gebildet. Diese Membran (Dicke 200 Å) hat viele verschieden große Poren mit einem Durchmesser von 650 bis 2000 Å. Neben diesen Zisternen finden sich dichte, homogene, osmiophile Einschlüsse von unterschiedlicher Form (Durch-

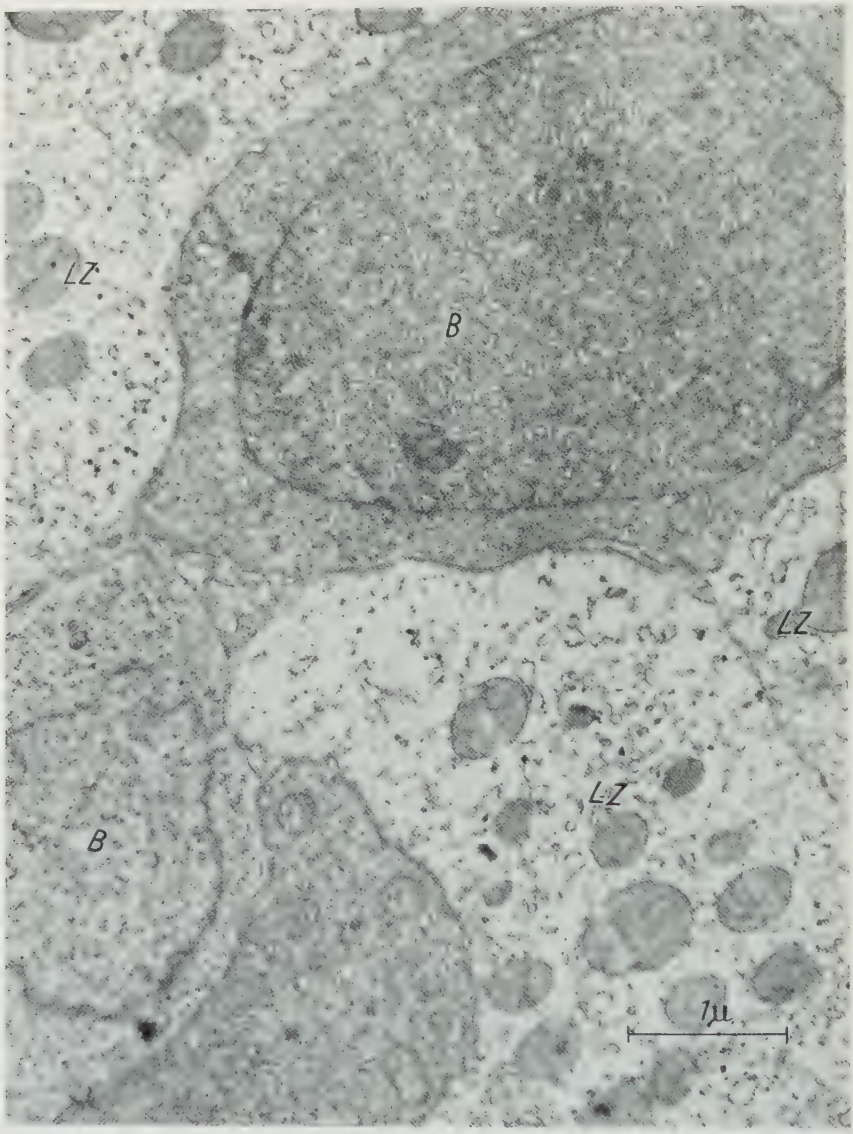

Abb. 5. Leberparenchym eines 10 Wochen alten menschlichen Embryos. Blutbildungszellen (*B*) Seite an Seite mit Leberzellen (*LZ*). 1:20000

messer zwischen 670 Å und 1 μ). In einigen Kupfferzellen liegen phagozytierte primitive Erythroblasten. In späteren Embryonalstadien (Mens V) fanden sich auch Kerne von Normozyten in den Kupfferzellen.

Der perisinusoidale oder Dissesche Raum der embryonalen Leber wird auf der Seite des Leberparenchyms von Leberzellen oder Blutbildungszellen begrenzt

(Abb. 1, 3). Die meisten großen polygonalen Leberzellen besitzen Cytoplasmafortsätze, die sich verzweigen und verschiedene Größe haben können. Diese Microvilli, die auch im Bereich der Endothellücken vorhanden sind, sind im Durchschnitt 240 mμ lang bei einem Durchmesser von 400 bis 1200 Å. Bemerkenswerte Anhäufungen von Mitochondrien und endoplasmatischen Membranen sind in der Nähe der Microvilli nicht festzustellen. Microvilli besitzen die fetalen Leberzellen auch dann, wenn zwischen Endothel und Parenchym einzelne embryonale Blutbildungszellen liegen. Tiefer im Parenchym lagern die embryonalen Blutbildungszellen und Leberzellen jedoch Seite an Seite. Die Leberzellen — hier ohne Microvilli — passen sich dann in ihrer Form den Blutbildungszellen an (Abb. 5).

Der zwischen Sinusendothel und Leberparenchym liegende perisinusoidale Raum war in den Lebern der von uns untersuchten 6 Embryonen überall zu beobachten. Er wird von den kurzen Zellfortsätzen der Endothelzellen und den Microvilli der Leberzellen offen gehalten. Der Dissesche Raum erstreckt sich mitunter auch zwischen zwei benachbarte Parenchymzellen mehr oder weniger tief hinein. Hier besitzen die Leberzellen ebenfalls Microvilli. Es kann dabei der Eindruck entstehen, daß diese Ausladungen des Disseschen Raumes eine Verbindung zu Gallenkapillaren herstellen. Eindeutige Zusammenhänge zwischen Disseschem Raum und Gallenkapillaren konnten wir jedoch nicht nachweisen (Abb. 2).

Die Verankerung des Endothels im Parenchym erfolgt durch Verhaken der kurzen Zellfortsätze der Sinusendothelzellen mit den Microvilli der Leberzellen. Fibrillen, die beide Gewebskomponenten verankern könnten, haben wir weder in den Endothelzellen noch im Disseschen Raum beobachtet.

Diskussion

In den Lebern 10 Wochen alter menschlicher Embryonen sind perisinusoidale Räume vorhanden, die auf der einen Seite vom Sinusendothel, auf der anderen von Leberzellen begrenzt werden. Der Inhalt der Lebersinus kann durch Öffnungen in der Sinuswand in den perisinusoidalen Raum übertreten und die Leberzellen überspülen. Dadurch kommt die durch Microvilli vergrößerte Oberfläche der Leberzellen in unmittelbare Berührung mit dem Blutplasma des Embryos. Die Möglichkeit einer guten Stoffaufnahme durch die Leberzellen aus dem Blutplasma ist dadurch gegeben. Ebenso ist eine Stoffabgabe von den Leberzellen an die Blutflüssigkeit gut möglich. Auch bei Embryonen aus Mens II—V fanden wir die Disseschen Räume stets ausgeprägt; ihre Weite ist überall gleich. Letztere ist vielleicht darauf zurückzuführen, daß beim Embryo immer nährstoffreiches Blut durch die Sinus fließt. Beim geborenen Menschen oder Tier schwankt dagegen die Konzentration der Nährstoffe im Blut stärker mit der Nahrungsaufnahme. Fawcett (1955), Rüttner und Vogel (1957) sowie Cossel (1959) konnten nämlich Unterschiede in der Größe des Disseschen Raumes bei Ratten und Diabetikern beobachten. Sie führten diese Unterschiede der Weite auf Reaktionen bei Änderungen im Stoffwechsel zurück.

Auch für die Blutbildung in der fetalen Leber ist der Dissesche Raum von Bedeutung. Die Blutzellen können durch die Öffnungen in der Sinuswand in den Disseschen Raum übertreten, ebenso aber auch neugebildete Blutzellen aus

dem perisinusoidalen Raum in das Sinuslumen. Unsere Untersuchungen hierüber sind noch nicht abgeschlossen.

Eine Filterwirkung der Sinuswand ist nicht anzunehmen, da die Lücken zu groß sind. Auffällig ist aber, daß keine Fibrillen und Kittsubstanz im Parenchym der Leber von Feten aus Mens II—V zu sehen sind. Dies hängt wahrscheinlich mit Lage und Form der Sinus und der Leberzellen zusammen. Die Sinus der Embryonen sind unregelmäßig in ihrer Form und Weite. Sie bilden insgesamt eine Einheit und bestehen noch nicht aus Gefäßindividuen. Auch liegen die Leberzellen unregelmäßig in Gruppen zwischen den Sinusteilen. Der Umbau des großen embryonalen Sinusraumes zur definitiven Leberkapillare bzw. Lebersinus und die Ordnung der Leberzellen zu Balken kann deshalb ohne den Widerstand von Bindegewebsfibrillen durchgeführt werden.

Am Aufbau der embryonalen Sinuswand sind zwei Zelltypen beteiligt. Neben den eigentlichen Sinusendothelien kommt eine Zellform vor, die den Kupfferzellen der fertigen Leber entspricht. Ihre Einschlüsse und großen Vakuolen sprechen für eine Funktion, die sich von der der Endothelzellen unterscheidet. Die Aufgabe der Kupfferzellen in der embryonalen Leber ist unklar. Bei der weißen Maus unterscheidet Schmidt (1960) drei Formen von Sinusendothelzellen. Sein Typ I besteht aus einem sehr dünnen Endothelsaum, Typ II setzt sich aus dünnen Cytoplasmalagen zusammen, Typ III sind die Kupfferschen Sternzellen. Obwohl sich Schmidts Befunde mit den unsrigen decken, betrachten wir seinen Typ I und II als zusammengehörig. Die mehrschichtigen Cytoplasmalagen erklären wir wie Cossel (1959) durch Überlappungen einzelner Zellenden.

Die perforierten bzw. diskontinuierlichen Sinuswände und die gut ausgeprägten Disseschen Räume bei menschlichen Embryonen sind von großer Bedeutung für die Funktionen der embryonalen Leber. Die Disseschen Räume in den Lebern erwachsener Menschen sind von Cossel (1959) und Lanzavecchia et al. (1959) beschrieben worden, während Braunsteiner et al. (1957) die perisinusoidalen Räume nicht beobachten konnte. Die positiven Befunde an fetalen Lebern machen eine erneute Prüfung der Verhältnisse in der Leber von erwachsenen Menschen erforderlich.

Zusammenfassung

Die Leber von 6 menschlichen Feten wurde elektronenmikroskopisch untersucht.

1. Es wurde festgestellt, daß bei menschlichen Embryonen aus Mens II—V das Sinusendothel aus gewöhnlichen Endothel- und Kupfferzellen besteht.

2. Die Sinuswand ist diskontinuierlich, d. h. sie weist Lücken auf, die bis zu 1 μ groß sind und keine Artefakte darstellen. Eine Filterwirkung des Disseschen Raumes wird für die Leber des menschlichen Embryos abgelehnt.

3. Ein perisinusoidaler oder Dissescher Raum ist vorhanden. Seine Weite schwankt zwischen 800 Å und 2,5 μ.

4. Der Dissesche Raum wird auf der einen Seite von Endothel- oder Kupfferzellen, auf der anderen Seite von Leberparenchym oder Blutbildungszellen begrenzt.

5. Der Dissesche Raum wird von kurzen Zellfortsätzen der Endothelzellen und den Microvilli der Leberzellen, die in den Disseschen Raum hineinhängen, offengehalten.

6. Fibrillen konnten im Disseschen Raum nicht beobachtet werden.

Literatur

Aterman, K.: Some observations on the sinusoidal cells of the liver. Acta anat. (Basel) **32**, 193—213 (1958).

Braunsteiner, H., J. Beyreder, G. Grabner u. A. Neumayr: Elektronenmikroskopische Beobachtungen an Leberzellen bei Serumhepatitis und Hepatitis epidemica. Klin. Wschr. **35**, 901—905 (1957).

Braunsteiner, H., K. Fellinger u. F. Pakesch: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Frage des Disseschen Raumes. Wien. klin. Wschr. **65**, 738—740 (1953).

Cossel, L.: Beitrag zur Blutgewebsgrenze in der Leber. Beitr. path. anat. **120**, 133—158 (1959).

Disse, J.: Über die Lymphbahnen der Säugetierleber. Arch. mikr. Anat. **36**, 203—224 (1890).

Fawcett, D. W.: Observations on the Cytology and Electron Microscopy of hepatic cells. J. nat. Cancer Inst. **15**, 1475—1489 (1955).

Hampton, J. C.: An electron microscopic study of the hepatic uptake and excretion of submicroscopic particles injected into the blood stream and into the bile duct. Acta anat. (Basel) **32**, 262—291 (1958).

Fitton-Jackson, S.: Persönliche Mitteilung an Prof. W. Schwarz 1958.

Kupffer, C. v.: Über die Sternzellen der Säugetierleber. Arch. mikr. Anat. **54**, 254—288 (1899).

Lanzavecchia, G., E. Poppi, G. Jean, A. le Coultre et E. Pisani: Struttura della cellula epatica umana, osservata al microscopio elettronico. Arch. ital. Anat. Embriol. **64**, 430—443 (1959).

Mayer, S.: Bemerkungen über die sog. Sternzellen der Leber und die Struktur der Kapillaren und Blutgefäße. Anat. Anz. **16**, 180—182 (1899).

Minot, C. S.: On a hitherto unrecognized form of blood circulation without capillaries in the organs of vertebrata. Proc. Boston Soc. natur. Hist. **29**, 185—211 (1900).

Parks, H. F.: The hepatic sinusoidal cell and its histological relationships. Electron Microsc. Proc. of Stockholm Conf. Sept. **1956**, S. 151—154.

Ranvier, L.: La système vasculaire, J. Migrographie **1**, 135—142 (1892).

Rouillier, Ch.: Les canalicules biliaires. Études au microscope électronique. C. R. Soc. Biol. (Paris) **148**, 2008—2012 (1954).

— Les canalicules biliaires. Acta anat. (Basel) **26**, 94—107 (1956).

Rüttner, I. R., u. A. Vogel: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Lebersinuswand. Verh. dtsch. Ges. Path. **41**, 314—319 (1957).

Schmidt, C. F.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an den Sinuswandzellen (Kupfferschen Sternzellen) der weißen Maus. Anat. Anz. **108**, 376—388 (1960).

Wassermann, F.: The structure of the wall of the hepatic sinusoids in the electron microscope. Z. Zellforsch. **49**, 13—32 (1958).

Watson, M. L.: Reduction of heating artifacts in thin sections examined in the electron microscope. J. biophys. biochem. Cytol. **3**, 1017—1023 (1957).

Dr. med. P.-M. Carsten, Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der Freien Universität Berlin, Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Straße 15

Zeitschrift für Zellforschung 54, 262—274 (1961)

Department of Anatomy, University of Tokyo, Medical School, Tokyo, Japan
(Director: Prof. Dr. J. Nakai)

ELECTRON MICROSCOPE OBSERVATIONS ON THE NERVE FIBERS OF *CRISTARIA PLICATA*

By

Yasuko Nakajima*

With 12 Figures in the Text

(Received February 11, 1961)

Introduction

In recent years the unmyelinated nerve fibers of invertebrates have been the subject of several electron microscope studies. Some papers have reported on the structure of the giant fibers (Geren and Schmitt 1954; Hess 1958; Hama 1959; Villegas and Villegas 1960), the tunicated nerve fibers of insects (Edwards, Ruska and de Harven 1958) and the intestinal nerve of *Helix* (Schlote 1957).

The present study is concerned with the fine structure of the cerebro-visceral connective of a fresh-water mussel, *Cristaria plicata*, with special reference to the relationship between axons and satellite cells. Since the morphological study revealed an interesting relationship between these structures, an attempt was also made to investigate the electrophysiological property of the nerve fibers. The detailed description of the electrophysiology of this nerve will be given elsewhere.

Material and Methods

The cerebro-visceral connective of *Cristaria plicata* is very convenient for morphological as well as electrophysiological studies, because it is long (about 4 cm) and is easily isolated from surrounding tissues.

a) Morphological studies. For electron microscopical studies, the connective was fixed *in situ* with 1 per cent osmium tetroxide buffered to p_H 7.4 with veronal acetate for about 5 minutes, then dissected out and the fixation was continued for 1 hour in a cold 1 per cent osmium tetroxide. The materials were washed with distilled water, dehydrated in graded ethanols and embedded in a mixture of 90 per cent n-butyl methacrylate and 10 per cent methyl methacrylate containing 2 per cent benzoyl peroxide as catalyst. Blocks were sectioned with glass knives on a JUM-4 ultramicrotome and were observed with a Hitachi electron microscope, model HU-10.

In the study of the distribution of axon diameter, the sections were placed on slit grids so as to reduce the numbers of axons hidden behind the bars of the grids. Magnification was controlled by the replica of diffraction grating.

For light microscopy, blocks were fixed in Bouin's fluid, and 5 μ paraffin sections were stained with H and E, Azan's trichrome stain, Masson's trichrome stain and Heidenhain's iron hematoxylin. Other blocks were fixed in formalin and stained with Sudan black. The materials were treated with osmium tetroxide to locate the myelinated nerve fibers, if any.

* The author wishes to appreciate the encouragement and advice of Professor Junnosuke Nakai (Anatomical Department of the University of Tokyo) and Associate Professor Atsushi Ichikawa (Anatomical Department of the University of Tohoku). Sincere thanks are expressed to Professor J. C. Sinclair (Anatomical Department of the University of Texas) for his kindness in correcting the manuscript. Thanks are also due to Dr. Shigehiro Nakajima (Physiological Department of the University of Tokyo) for his collaboration in respect of the electrophysiological aspect of this study.

b) Recording of action current. The isolated cerebro-visceral connective was mounted on a series of silver wire electrodes; the distance between each pairs of electrodes was usually 2.5 mm. One pair of electrodes, connected with a DC differential amplifier and an oscilloscope, was used for recording action currents. Urethan was employed to achieve monophasity of the action current. The other pair of electrodes was used to stimulate the nerve. Stimulating current was obtained from an isolating unit of a square pulse generater. The stimulating voltage for the supramaximal stimulation was usually about 1 volt with the pulse of about 30 msec duration.

Results

1. Light microscopy

Fig. 1 shows a transeverse section of the connective. It is a single cylindrical tract about 0.5 mm in diameter and is not subdivided into bundles. Its surface

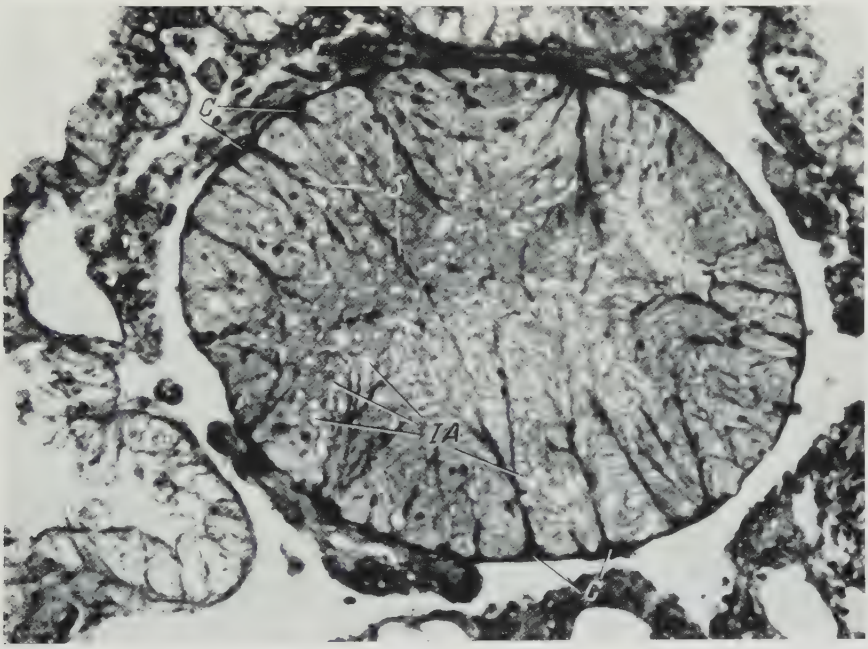

Fig. 1. Transverse section of the cerebro-visceral connective of *Cristaria plicata*. HEIDENHAIN's iron hematoxylin. The wedge-shaped projections of the sheath consisting of the connective tissue are driven into the connective at several points. Therefrom the ramifying satellite cells extend into the interior of the connective. Only the relatively large axons are seen. The connective is not grossly subdivided into fascicles. Magnification, 120. *A* axon, *C* connective tissue sheath of the connective, *ER* endoplasmic reticulum, *F* fibril in the satellite cell, *G* osmiophilic granule in the satellite cell, *Gr* granule in the axon, *IA* large axon, *IV* large vesicle in the satellite cell, *M* mitochondria, *N* nucleus of the satellite cell, *NF* neurofilament, *S* satellite cell, *sA* small axon, *Sp* space between satellite cells, *sV* small vesicle in the satellite cell, *T* transitional type between granule and vesicle in the axon, *V* vesicle in the axon

is covered with the sheath which projects into the connective at several points forming wedge-shaped processes. Connective tissue dyes stain this sheath, but not the remainder of the connective. By treatment with osmium tetroxide no myelinated nerve fibers are observed. The unmyelinated nerve fibers are not individually visible. However, many circular contours are seen in the connective (Fig. 1, arrow *IA*): they appear to be relatively large axons. The satellite cells[1],

[1] The cells which are distributed among the axons will be called the satellite cells in this paper.

wherein the oval nuclei and the Sudan black granules are contained, have processes which send extensive processes among the axons (Figs. 1 and 2).

2. *Electron microscopy*

a) Axon. Electron microscopy reveals that all axons in the connective are unmyelinated. Each axon possesses an axolemma averaging 100 Å thick which encloses a rather light axoplasm. In transverse sections, small axons have almost circular profiles and large axons have somewhat sinuous ones. However, the

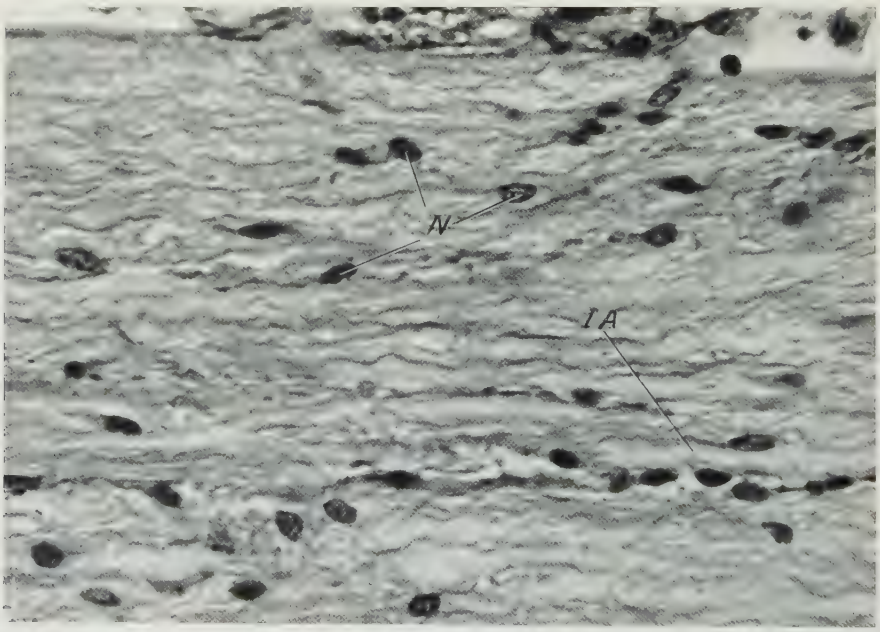

Fig. 2. Longitudinal section of the connective. HEIDENHAIN's iron hematoxylin. Magnification, 600

axolemma of the latter does not invaginate to any considerable distance into the axoplasm (Figs. 3—7). The diameters of the axons vary between 0.05 and 6.0 μ but most of them are less than 0.8 μ (Figs. 3—7 and 11).

The axoplasm contains neurofilaments, mitochondria and some tubule-like structures which appear to be the endoplasmic reticulum. The neurofilaments run in various directions but predominantly in a longitudinal arrangement (Fig. 8). The mitochondria are ovoid or long sausage-shaped. Their long axes are usually parallel with those of the nerve fibers and their width is a almost constant at around 0.1—0.2 μ in cross sections (Figs. 3—8).

Some axons contain the granules whose diameters are about 700—1,500 Å. They are very dense and are surrounded by a limiting membrane. Usually the granules are scattered singly or in small groups (Figs. 3, 4 and 6). More rarely these granules are found in clumps occupying a large part of the axons (Fig. 9). In the latter case, the vesicles are scattered among the dense granules, and transitional types between granule and vesicle, having some internal structures, are also seen (Fig. 9).

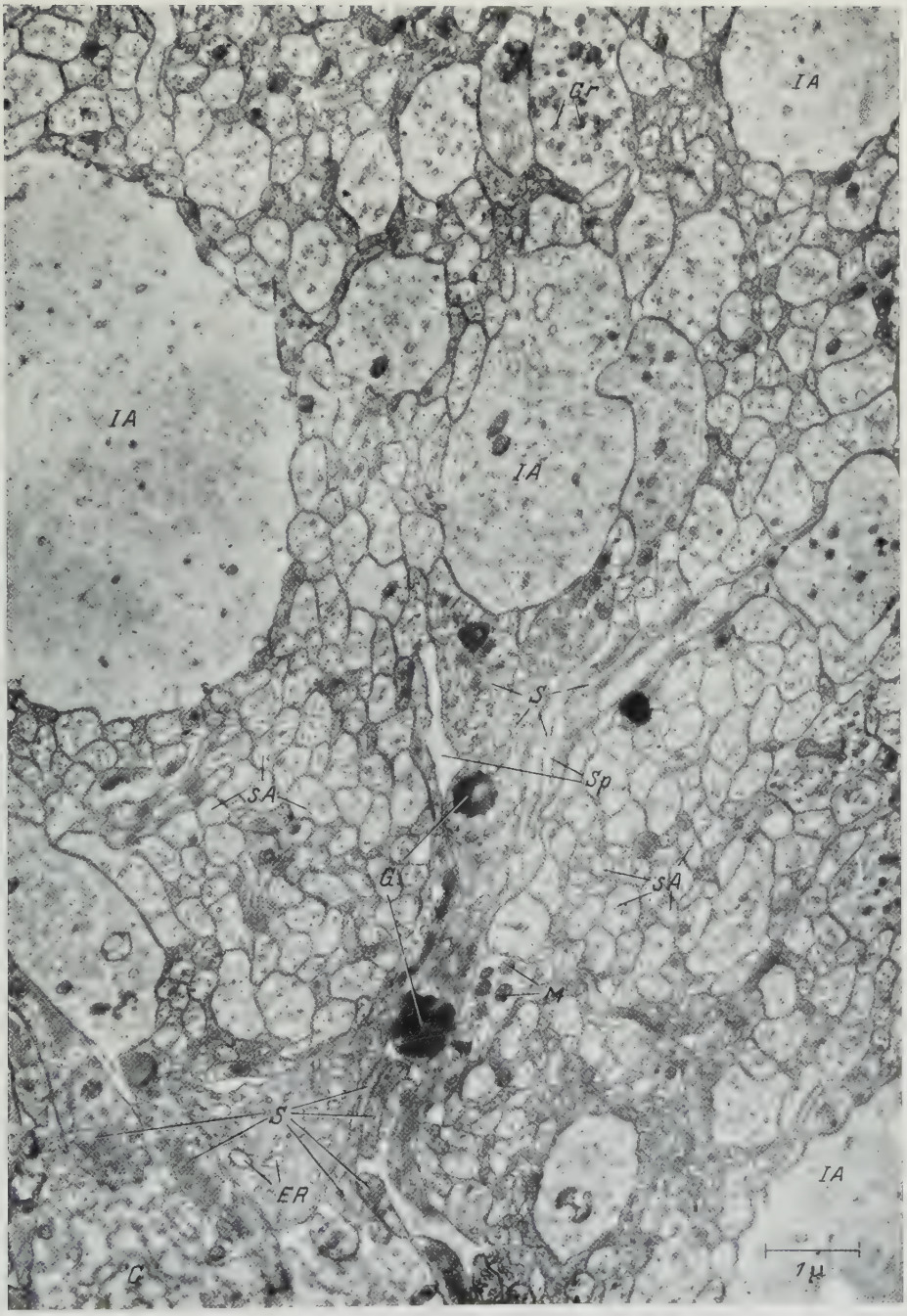

Fig. 3. Electron micrograph of transverse section of the connective. The satellite cells near the projection of the sheath form a cord where the spaces between the cells are variable and large, and the cells ramify running toward the interior of the connective. In the cytoplasm of the satellite cells there are osmiophilic granules and the rough surfaced endoplasmic reticulum. There are several large axons and numerous small axons both of which are usually not enclosed by the satellite cells. Magnification, 12,500

b) Satellite cells. In electron micrograph, the satellite cells have extensively ramifying processes covered by plasma membranes (Fig. 3). The distribution of the satellite cells in the connective and their relationship to the axons and to the sheath of the connective will be described later.

The nuclei of the satellite cells are oval. The nuclear membrane consists of two opaque layers with a lighter interspace. The nucleus has a fine granular

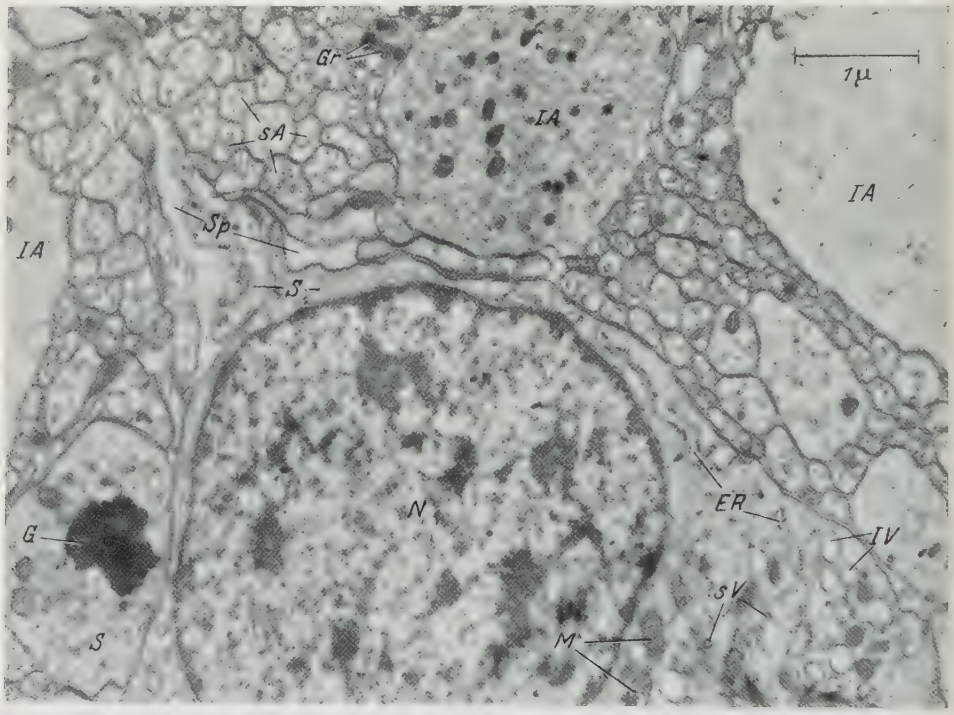

Fig. 4. Electron micrograph of transverse section of the connective. The cytoplasm of the satellite cells contains the rough surfaced endoplasmic reticulum, small and large vesicles, and osmiophilic granules. Large and small axons are apposed with each other separated only by a small gap. Between a satellite cell and an axon there is a gap similar to that existing between axons. Between satellite cells large spaces are present. Magnification, 16,700

content. The granules are assembled densely at the nuclear membrane but are also abundant throughout the nucleus, frequently in aggregations (Figs. 4 and 5).

The cytoplasm of the satellite cells is most profuse in the nuclear zone. It contains small mitochondria, two types of vesicular structure described below and osmiophilic granules and fibrils (Figs. 3—6).

Mitochondria are small and oval in shape and bounded by a triple layered outer membrane. Their inner membranes which are also triple layered often take an irregular course (Figs. 4 and 5).

There are at least two kinds of vesicles in the satellite cells: The smaller vesicles usually about 450—800 Å in diameter are found generally in the perinuclear zone; the larger vesicles vary greatly in size from about 1,100—2,600 Å in diameter and are located occasionally adjacent to the plasma membrane (Figs. 4 and 5).

As in figures 3, 4 and 6, osmiophilic granules about 0.8—0.5 μ in diameter are not infrequently seen in the perinuclear region as well as in the processes. These granules have irregular contours and no organized internal structure. They appeared to correspond to the Sudan black granules of lipid nature in light microscopy. These granules are similar to those found by Elfvin (1958) in the Schwann cells in the splenic nerve fibers of cats.

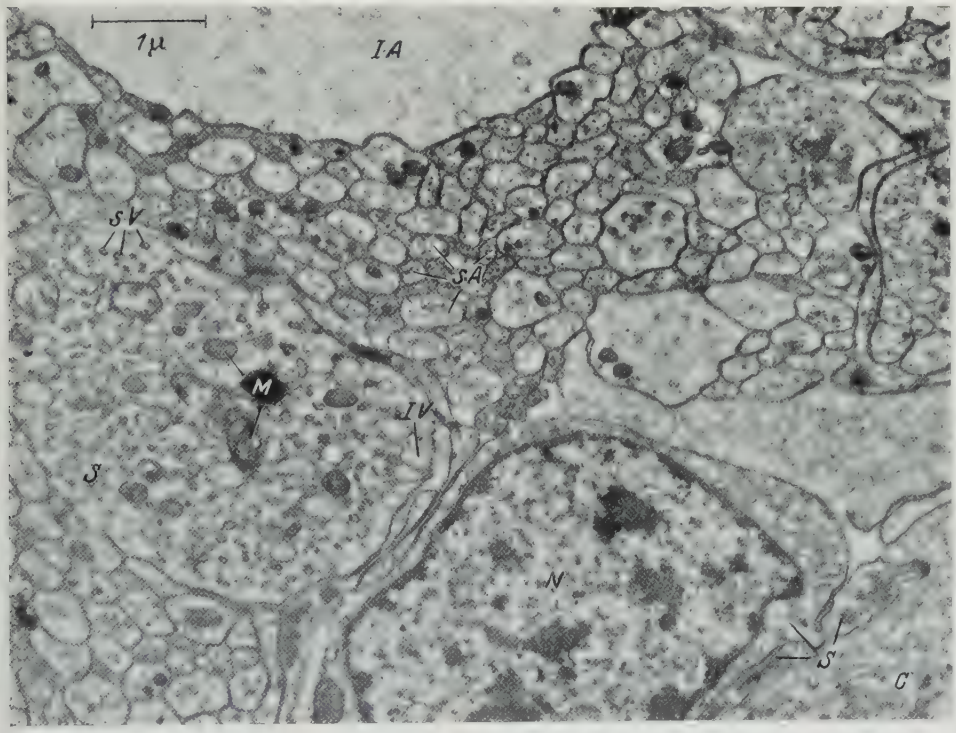

Fig. 5. Electron micrograph of transverse section of the connective. In the lower half of the figure, a connective tissue sheath and the satellite cells are shown. The cytoplasm of the satellite cell contains mitochondria with irregular cristae, small and large vesicles. Some large vesicles are apposed to the plasma membrane. Magnification, 14,900

Frequently, but not always, intracellular bundles of fibrils are seen in the processes. They are fine, and closely packed together as is shown in Fig. 6. Rarely these fibrils are present in the perinuclear region. The fibrils resemble those described by Gray (1959) and Luse (1956) in the processes of the glia cells of the cerebral cortex.

c) The sheath of the connective. The cerebro-visceral connective is covered by a thin connective tissue which largely consists of collagen fibrils with an irregular course (Figs. 3 and 5). In transverse sections, the wedge-shaped projections of the sheath are driven into the connective at several points (Fig. 3).

d) The relation of satellite cells and axons. The satellite cells which are in contact with the surface of the connective tissue sheath separate it from the underlying axons (Figs. 3 and 5), and no collagen fibrils are observed in the interior of the connective. Most of the cells originate from the wedge-shaped

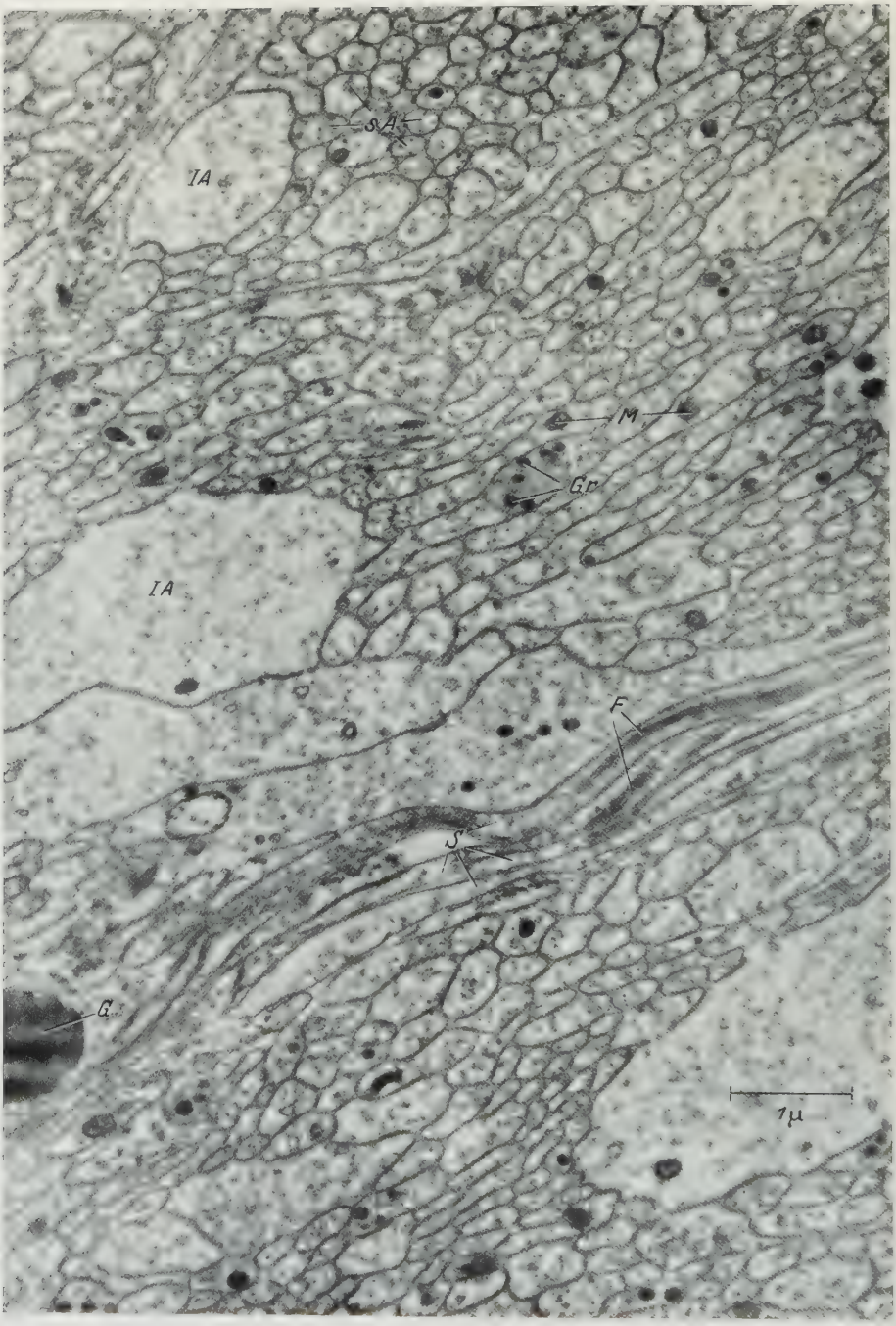

Fig. 6. Electron micrograph of oblique section of the connective. The processes of the satellite cells contain intracellular bundles of fibrils which resemble glial fibrils. Magnification, 16,700

projections running into the connective. The cells near the projection form a cord which ramifies toward the interior of the connective, and some of the pro-

cesses are in contact with the others originated from the other projections. However, they neither envelop axons respectively, nor subdivide the connective into smaller fascicles. No structure corresponding to the mesaxon can be found (Figs. 3—8).

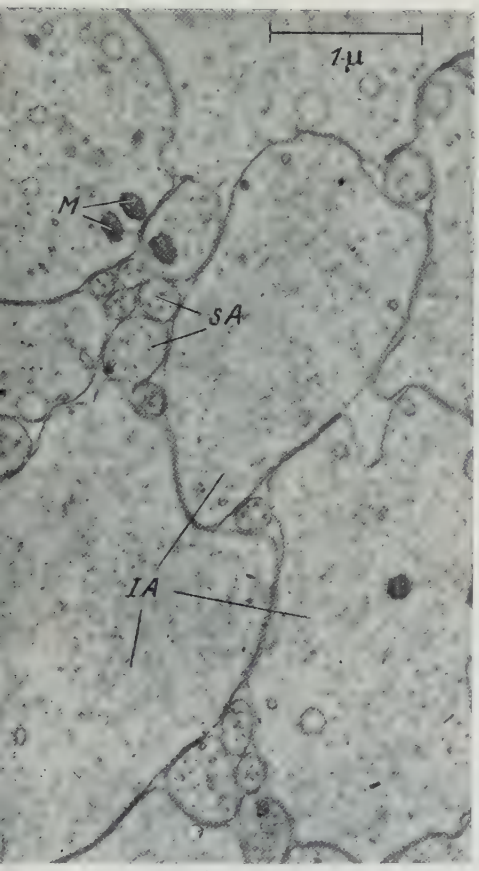

Fig. 7

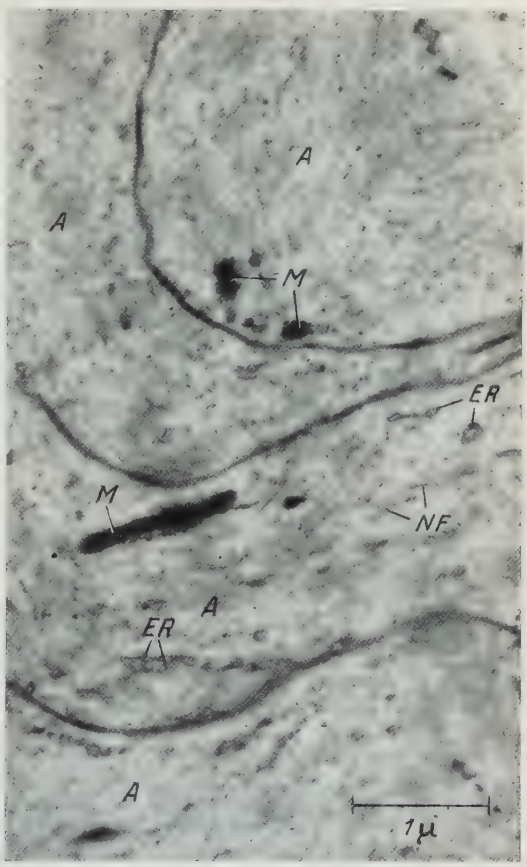

Fig. 8

Fig. 7. Electron micrograph of transverse section of the connective. Small and large axons are packed with each other and no cytoplasm of the satellite cells is present between axons. Magnification, 20,000

Fig. 8. Electron micrograph of longitudinal section of the connective. The axons are in contact with each other separated only by a small gap without intervening of satellite cells. They contain neurofilaments, mitochondria and some membrane bound profiles which appear to be the endoplasmic reticulum. Magnification, 18,000

Therefore, the satellite cells, sometimes connected with each other, are scattered in the closely packed axons in the interior of the connective. Fig. 10 is a schematic representation of this relationship. Both large and small axons are usually flanked on all sides by other axons except those in contact with satellite cells. A small space of about 150 Å separates axons from each other and from a plasma membrane of the satellite cell. On the other hand, the spaces between adjacent satellite cells close to the wedge-shaped projection are variable and sometimes reach about 0.2 μ.

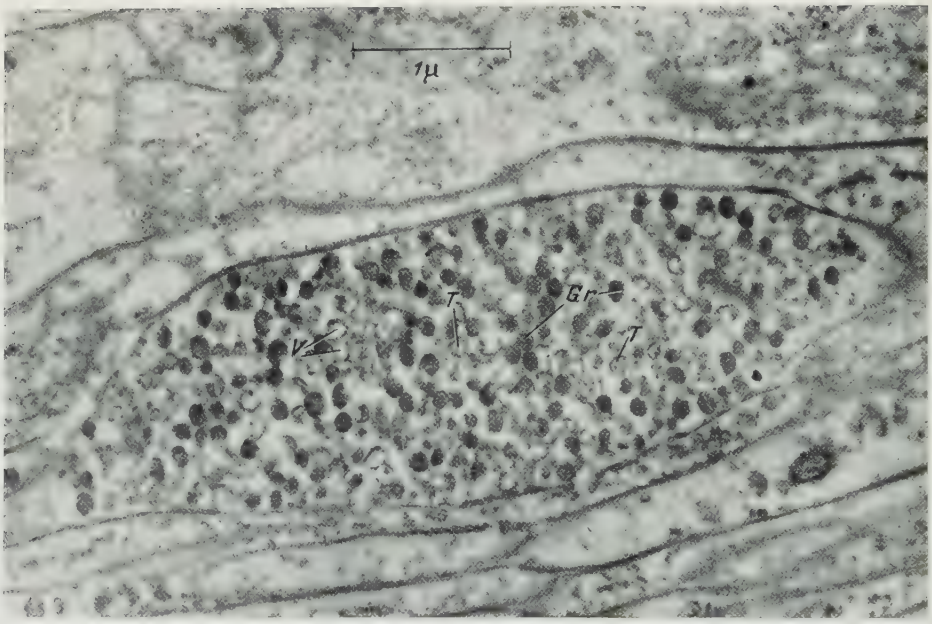

Fig. 9. Electron micrograph of the connective, showing an axon containing numerous electron dense granules. Some of them have a limiting membrane. The vesicles are scattered among the granules and the transitional types between granule and vescicle are also seen. Magnification, 21,300

Fig. 10. Schematic representation of the relationship between axons and satellite cells in a transverse section of the cerebro-visceral connective of *Cristaria plicata*. Thin lines represent axonal membranes; thick lines represent membranes of the satellite cells

3. Distribution of diameters of the axons

Fig. 11 represents the distribution of diameters of the axons. Although the satellite cells and the axons are often similar in appearance in transverse sections,

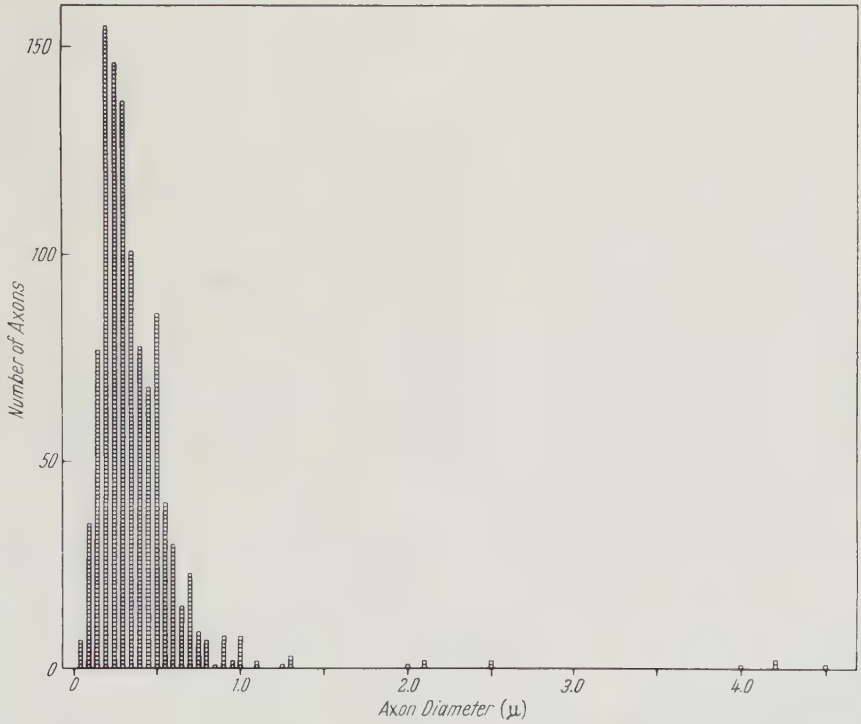

Fig. 11. Distribution of axons according to size in the cerebro-visceral connective of *Cristaria plicata*

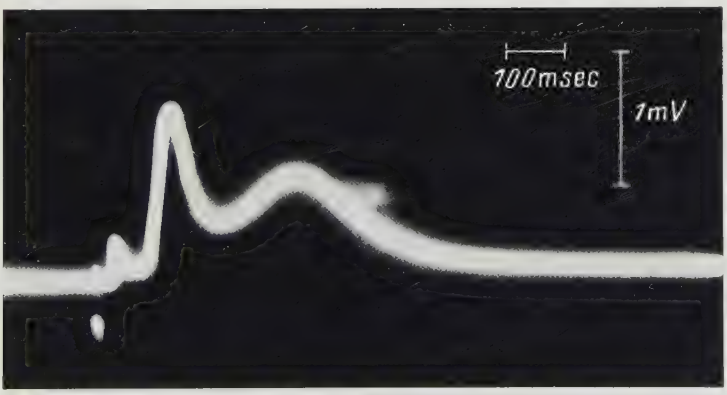

Fig. 12. The conducted action current of the cerebro-visceral connective. Conduction distance is 1.0 cm. Three elevations are clearey seen

they are distinguishable by the difference in the density of the cytoplasm and in the appearance of organelles together with cytoplasmic inclusions. The diameters of 1,043 fibers were measured.

The size ranged between 0.05 and 4.5 μ. The small axons of 0.2 to 0.4 μ in diameter are most frequent (Fig. 11).

4. Action current

The experiments were done at room temperatures between 15—17° C. Fig. 12 represents an example of a monophasic action current, the conduction distance being 1.0 cm. The monophasic action current usually had three elevations (Fig. 12). The first and the second elevations were always distinctly separated. But the third elevation was small and sometimes not seen at all. The conduction velocities, which were measured by using a series of records with different conduction distances, were 300—400 mm/sec for the first elevation, 60—80 mm/sec for the second and 30—40 mm/sec for the last one.

Discussion

In the unmyelinated nerves of the vertebrate, each axon is usually enclosed by a SCHWANN cell (GASSER 1955; HESS 1956; ROBERTSON 1957; CAUSEY 1960), while in the olfactory nerves (GASSER 1956; DE LORENZO 1957) and in the optic nerve of Anura (MATURANA 1960), many small unmyelinated axons form the compact fascicles which are closely bounded by one or several glia cells. In the invertebrate nerve fibers hitherto reported, the relation is generally looser than those in the vertebrate, except for large axons which have an intimate relation to the satellite cells; for example, the giant nerve fibers (GEREN and SCHMITT 1954; HESS 1958; HAMA 1959; VILLEGAS and VILLEGAS 1960), the insect tunicated nerve fibers (EDWARDS, RUSKA and DE HARVEN 1958) and large axons in the intestinal nerve of *Helix* (SCHLOTE 1957) were reported to be enclosed by a single or several satellite cells. Compared with the above nerves, the present investigation reveals that the nerve fibers of *Cristaria plicata* show the loosest relationship of axons to satellite cells; namely, the connective is not subdivided into fascicles by the satellite cells, neither large nor small axons are enveloped by the satellite cells and many axons are flanked on all sides by other axons separated only by a small gap.

The granules in the axon resemble morphologically those described by HESS (1958) in cockroach and by SCHLOTE (1957) in *Helix*, and also resemble the neurosecretion granules reported by PALAY (1957), BARGMANN and KNOOP (1957), BARGMANN, KNOOP and THIEL (1957), and SANO and KNOOP (1959) etc. But their nature is not clear in the present investigation.

One question is; of what origin is the satellite cell? SCHLOTE (1957) tentatively described the satellite cells in the intestinal nerve of *Helix* as connective tissue cells. On the other hand, SCHMIDT (1900, 1901), reported that in the nerve of *Helix* there were glia cells. HESS (1958) studied the abdominal connective of cockroach and called its satellite cells the glia cells, though they are morphologically entirely like the Schwann cells of the peripheral nerves. In the present study of the cerebro-visceral connective of *Cristaria plicata*, it seems reasonable to classify the cells as glia cells rather than Schwann cells, because of appearance of fibrils in these cells which are very similar to glial fibrils, and also because of the loose relationship between the cells and axons.

The relation between axon diameter and conduction velocity of nerve fibers has been studied on the myelinated (GASSER and GRUNDFEST 1939) and on the unmyelinated nerve fibers of vertebrates (GASSER 1955). He analyzed the size distribution of the unmyelinated fibers in a sural nerve of the cat by electron micrographs. His result confirmed the view that the velocities of conduction in the fibers could be precisely accounted for by multiplying the diameters by a constant. In the present study although the reconstruction of the action potential was not made, the distribution of the axon diamter suggested that the first small elevation of the action current originated from the group of larger axons and that the second and the third elevations came from those of smaller, but much more numerous axons. When the compound action currents, at four distances of conduction, were mounted at even spacings corresponding to equal increments of conduction distances, it was found that there were linear velocities for the first and the second elevations. Therefore, it is conceivable that there is no suprathreshold interaction between the first and the second elevations of the action current, though the large and small axons are packed with each other without being ensheathed by the satellite cells. Further details of the electrophysiology of this nerve especially with reference to the infrathreshold interaction and negative after potential will be described elsewhere.

Summary

The fine structure and electrophysiological properties of the cerebrovisceral connective of a fresh-water mussel, *Cristaria plicata*, were studied. All axons in the connective, whose diameters range from 0.05 to 6.0 μ, are unmyelinated and they are not ensheathed by satellite cells like Schwann cells. The satellite cells are scattered in large numbers among the axons and have extensive arborizations but they do not subdivide the connective into fascicles. Therefore, most of the axons are flanked on all sides by other axons and separated from each other only by a small gap about 100—250 Å wide. The cytoplasm of a satellite cell contains osmiophilic granules and fibrils. Some axons contain small granules which resemble neurosecretion granules.

The action current of the connective showed three elevations. The conduction velocities were 300—400 mm/sec, 60—80 mm/sec and 30—40 mm/sec respectively. There was no evidence indicating the existence of a suprathreshold interaction among the axons.

Bibliography

BARGMANN, W., u. A. KNOOP: Elektronenmikroskopische Beobachtungen an der Neurohypophyse. Z. Zellforsch. **46**, 242—251 (1957).

— — u. A. THIEL: Elektronenmikroskopische Studie an der Neurohypophyse von *Tropidonotus natrix* (mit Berücksichtigung der Pars intermedia). Z. Zellforsch. **47**, 114—126 (1957).

CAUSEY, G.: The cell of Schwann, p. 44—72. Edinburgh and London: E. and S. Livingstone 1960.

EDWARDS, G. A., H. RUSKA and E. DE HARVEN: Electron microscopy of peripheral nerves and neuromuscular junctions in the wasp leg. J. biophys. biochem. Cytol. **4**, 107—114 (1958).

— — — Neuromuscular junctions in flight and tymbal muscles of the cicada. J. biophys. biochem. Cytol. **4**, 251—256 (1958).

ELFVIN, L.-G.: The ultrastructure of unmyelinated fibers in the splenic nerve of the cat. J. ultrastruct. Res. **1**, 428—454 (1958).

GASSER, H. S.: Properties of dorsal root unmyelinated fibers on the two sides of the ganglion. J. gen. Physiol. **38**, 709—728 (1955).

— Olfactory nerve fibers. J. gen. Physiol. **39**, 473—496 (1956).

—, and H. GRUNDFEST: Axon diameters in relation to the spike dimensions and the conduction velocity in mammalian A fibers. Amer. J. Physiol. **127**, 393—414 (1939).

GEREN, B. B., and F. O. SCHMITT: The structure of the Schwann cell and its relation to the axon in certain invertebrate nerve fibers. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **40**, 863—870 (1954).

GRAY, E. G.: Electron microscopy of neuroglial fibrils of the cerebral cortex. J. biophys. biochem. Cytol. **6**, 121—122 (1959).

HAMA, K.: Some observations on the fine structure of the giant nerve fibers of the earthworm, *Eisenia foetida*. J. biophys. biochem. Cytol. 6, 61—66 (1959).

HESS, A.: The fine structure and morphological organization of non-myelinated nerve fibers. Proc. roy. Soc. B **144**, 496—506 (1956).

— The fine structure and morphological organization of the peripheral nerve-fibers and trunks of the cockroach (*Periplaneta americana*). Quart. J. micr. Sci. **99**, 333—340 (1958).

— The fine structure of nerve cells and fibers, neuroglia, and sheaths of the ganglion chain in the cockroach (*Periplaneta americana*). J. biophys. biochem. Cytol. **4**, 731—742 (1958).

LORENZO, A. J. DE: Electron microscopic observations of the olfactory mucosa and olfactory nerve. J. biophys. biochem. Cytol. **3**, 839—850 (1957).

LUSE, S. A.: Electron microscopic observations of the central nervous system. J. biophys. biochem. Cytol. **2**, 531—542 (1956).

MATURANA, H. R.: The fine anatomy of the optic nerve of Anurans — an electron microscope study. J. biophys. biochem. Cytol. **7**, 107—120 (1960).

PALAY, S. L.: Ultrastructure and cellular chemistry of neural tissue, p. 31—49. In H. WAELSCH (Ed.) New York: Hoeber-Harper 1957.

ROBERTSON, J. D.: New observations on the ultrastructure of the membranes of frog peripheral nerve fibers. J. biophys. biochem. Cytol. **3**, 1043—1048 (1957).

SANO, Y., u. A. KNOOP: Elektronenmikroskopische Untersuchungen am kaudalen neurosekretorischen System von *Tinca vulgaris*. Z. Zellforsch. **49**, 464—492 (1959).

SCHLOTE, F. W.: Submikroskopische Morphologie von Gastropodennerven. Z. Zellforsch. **45**, 543—568 (1957).

SMIDT, H.: Über die Darstellung der Begleit- und Gliazellen im Nervensystem von *Helix* mit der Golgimethode. Arch. mikr. Anat. **55**, 300—313 (1900).

— Weitere Untersuchungen über die Glia von *Helix*. Anat. Anz. **19**, 267—271 (1901).

VILLEGAS, G. M., and R. VILLEGAS: The ultrastructure of the giant nerve fibre of the squid: Axon-Schwann cell relationship. J. ultrastruct. Res. **3**, 362—373 (1960).

Dr. YASUKO NAKAJIMA, Dept. of Anatomy, University of Tokyo, Medical School, Hongo, Tokyo/Japan

Aufnahmebedingungen

I. Sachliche Anforderungen

1. Der Inhalt der Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören.

2. Die Arbeit muß wissenschaftlich wertvoll sein und Neues bringen. Bloße Bestätigungen bereits anerkannter Befunde können, wenn überhaupt, nur in kürzester Form aufgenommen werden. Dasselbe gilt von Versuchen und Beobachtungen, die ein positives Resultat nicht ergeben haben. Arbeiten, rein referierenden Inhalts werden abgelehnt, vorläufige Mitteilungen nur ausnahmsweise aufgenommen. Polemiken sind zu vermeiden, kurze Richtigstellung der Tatbestände ist zulässig. Aufsätze spekulativen Inhalts sind nur dann geeignet, wenn sie durch neue Gesichtspunkte die Forschung anregen.

II. Formelle Anforderungen

1. Das Manuskript muß leicht leserlich (möglichst in Maschinenschrift) geschrieben sein. Die Abbildungsvorlagen sind auf besonderen Blättern beizufügen. Diktierte Arbeiten bedürfen der stilistischen Durcharbeitung zwecks Vermeidung von weitschweifiger und unsorgfältiger Darstellung. Absätze sind nur zulässig, wenn mit ihnen ein neuer Gedankengang beginnt.

2. Die Arbeiten müssen *kurz* und stilistisch einwandfrei geschrieben sein. Ausführliche historische Einleitungen sind zu vermeiden. Die Fragestellung kann durch wenige Sätze klargelegt werden. Der Anschluß an frühere Behandlungen des Themas ist durch Hinweis auf die letzten Literaturzusammenstellungen (in Monographien, „Ergebnissen", Handbüchern) herzustellen.

3. Der Weg, auf dem die Resultate gewonnen wurden, muß klar erkennbar sein; jedoch hat eine ausführliche Darstellung der Methodik nur dann Wert, wenn sie wesentlich Neues enthält.

4. Jeder Arbeit ist eine kurze Zusammenfassung (höchstens 1 Seite) der wesentlichen Ergebnisse anzufügen, die in einer der Kongreßsprachen abgefaßt sein kann.

5. Von jeder Versuchsart bzw. jedem Tatsachenbestand ist in der Regel nur *ein* Protokoll im Telegrammstil als Beispiel in knappster Form mitzuteilen. Das übrige Beweismaterial kann im Text oder, wenn dies nicht zu umgehen ist, in Tabellenform gebracht werden; dabei müssen aber umfangreiche tabellarische Zusammenstellungen unbedingt vermieden werden. Es wird empfohlen, durch eine Fußnote daraufhinzuweisen, in welchem Institut das gesamte Beweismaterial eingesehen oder angefordert werden kann.

6. Die *Abbildungen* sind auf das unbedingt Notwendige zu beschränken. Kurven, Diagramme usw., die nur zur Illustration von Befunden dienen und ohne weiteres im Text beschrieben werden können, werden zurückgewiesen. Knappe, klare Abbildungsunterschriften (Legenden) erübrigen nochmalige Beschreibung im Text. Sie sind getrennt von den Abbildungen dem Manuskript im Anschluß an das Literaturverzeichnis beizufügen. Unzulässig ist die *doppelte* Darstellung in Abbildung *und* Kurve. Bereits veröffentlichte Abbildungen können nicht wiederholt werden. Ausnahmen hiervon sind nur in besonders begründeten Fällen möglich. *Farbige* Bilder können in der Regel keine Aufnahme finden. Für Kurven oder Schwarzweißzeichnungen, die als Strichätzung reproduziert werden können, genügt die Ablieferung sauberer, klarer Skizzen, die vom Verlag umgezeichnet werden. Bei Halbtonbildern (Photos, Mikrophotos, Halbtonzeichnungen) sind saubere, scharfe und tonwertreiche Originalvorlagen (Hochglanzabzüge von Originalphotographien) notwendig. Besondere Wünsche des Autors hinsichtlich des linearen Verkleinerungs- und Vergrößerungsmaßstabes der Vorlagen sollen vermerkt werden.

Die *Beschriftung* der Abbildungen mit Buchstaben oder Ziffern erfolgt durch den Verlag. Die Hinweise hierfür sollen keinesfalls in der Abbildung selbst, sondern auf einem darüberliegenden transparenten Deckblatt angegeben werden. Dort sind auch Abstriche oder gewünschte Bildausschnitte zu bezeichnen. Hinweispfeile oder -linien sind ebenfalls auf dem Deckblatt anzubringen, wobei die Endpunkte durch Einstich mit einer feinen Nadel auf der darunterliegenden Originalvorlage fixiert werden sollen. Es empfiehlt sich ferner, auf dem Deckblatt wichtige Abbildungspartien zu kennzeichnen, damit die Kunstanstalt bei der Ätzung ihr besonderes Augenmerk darauf richten kann.

7. Literaturangaben sollen Autorennamen, vollständigen Titel der Arbeit, Zeitschrift, Band- und Seitenzahl sowie Jahreszahl umfassen [z.B. Böke, W.: Untersuchungen des Linsenepithels mit dem Phasenkontrastmikroskop. Z. Zellforsch. 38, 428—454 (1953)]. Die Literaturangaben sind am Schluß der Arbeit nach den Autorennamen alphabetisch anzuordnen und nicht zu numerieren. Werden mehrere Arbeiten des gleichen Autors zitiert, so ist an der betreffenden Stelle im Text eine in Klammern gesetzte 1, 2 bzw. 3 hinter dem Autorennamen einzufügen. Im Literaturverzeichnis steht diese Zahl, ebenfalls in Klammern gesetzt, vor der betreffenden Arbeit. Bücher müssen mit vollem Titel, Auflage, Ort, Verlag und Jahr zitiert werden.

8. Methodik, Protokolle und weniger wichtige Teile des Textes sind für *Kleindruck* vorzumerken. Die Lesbarkeit des Wesentlichen wird hierdurch gehoben.

9. Doppeltitel sind aus bibliographischen Gründen unerwünscht. Das gilt insbesondere, wenn die Autoren in Ober- und Untertitel einer Arbeit nicht die gleichen sind.

10. An *Dissertationen*, soweit deren Aufnahme überhaupt zulässig erscheint, werden nach Form und Inhalt dieselben Anforderungen gestellt wie an andere Arbeiten. Danksagungen an Institutsleiter, Dozenten usw. werden nicht abgedruckt. Zulässig sind einzeilige Fußnoten mit der Mitteilung, wer die Arbeit angeregt und geleitet oder wer die Mittel dazu gegeben hat. *Festschriften* und *Monographien* gehören nicht in den Rahmen einer Zeitschrift.

An Experimental Study of Pituitary Tumours

Genesis, Cytology and Hormone Content

By Dr. KWA HONG GIOK,
The Netherlands' Cancer Institute, Amsterdam

Mit 17 Abbildungen. IV, 94 Seiten Gr.-8°. 1961. DM 19,80
(In englischer Sprache)

CONTENTS

Introduction · Pituitary tumours in mice and rats: A survey of the literature. Discussion. Summary and conclusions · The incidence and the rate of growth of experimental pituitary tumours in various strains of mice and in rats: Experimental. Discussion and conclusion · Morphological characteristics of experimental pituitary tumours of mice of different inbred strains: Comparison of the morphology of oestrone-induced and "radiothyroidectomy"-induced pituitary tumours employing a tri-chrome stain. Differentiation of the two types of pituitary tumours by the PAS reaction · The thyroid stimulating hormone (TSH) content of experimentally induced pituitary tumours in mice: Substances in mouse pituitary homogenates interfering with a comparative TSH-assay. Comparative assays of the TSH content of pituitaries of mice treated in various ways to induce pituitary tumour development · General Summary · References.

SPRINGER-VERLAG · BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg — Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz A G., Würzburg
Printed in Germany